

THESIS MUNICH

1965

**Untersuchungen zur Physiologie
der exkretorischen Pankreasfunktion**

Horst-Peter Stahlheber

Untersuchungen zur Physiologie der exkretorischen Pankreasfunktion

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Horst-Peter Stahlheber
Bochum i. W.

München 1965

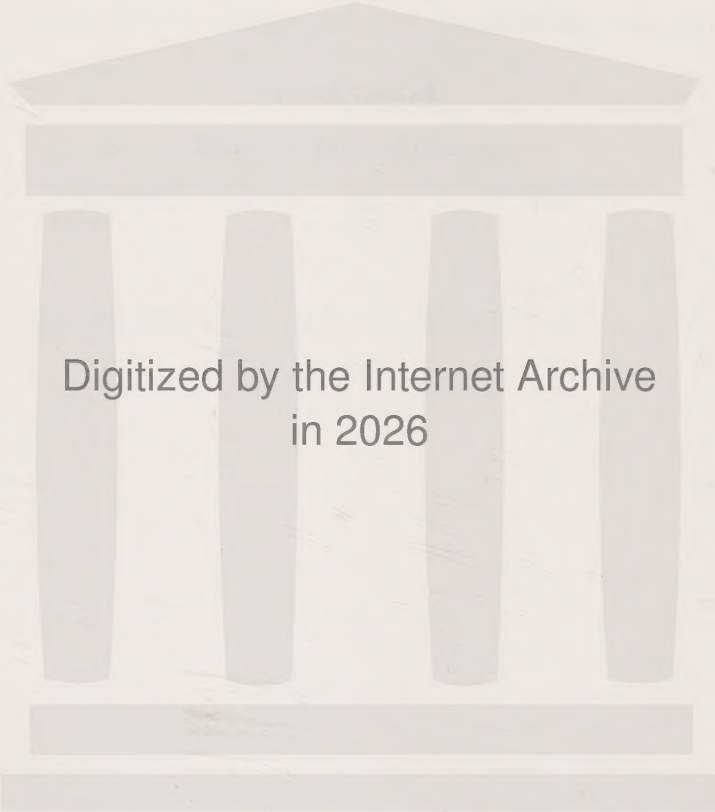
Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.M.M.Forell
Mitberichterstatter: Prof.Dr.Dr.G.Bodechtel
Dekan: Prof.Dr.O.Hug

Tag der mündlichen Prüfung: 22.Juni 1965

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153516_0070

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	Seite
Einführung	1
Methodik	6
Untersuchungen über die Hemmwirkung des menschlichen Duodenalsaftes auf kristallines Trypsin	9
Die Sekretion des Pankreas nach Sekretin- und Pankreozyminreiz	19
I. Sekretinreiz	19
II. Pankreozyminreiz	27
Klinische Auswertung von Sekretintesten	33
Der Einfluß von Kalzium auf die proteolytische Aktivität der Enzyme im Duodenalsaft	37
Einfluß der Galle auf die Aktivität der Enzyme im Duodenalsaft	40
Diskussion	45
Zusammenfassung	49
Tabellarischer Anhang	51
Literaturverzeichnis	54

EINFÜHRUNG

=====

Im exkretorischen Drüsenanteil des Pankreas wird ein wesentlicher Teil der zur Verdauung der Nahrung notwendigen Enzyme gebildet. Es sind dies verschiedene Proteasen zur Eiweißverdauung, Lipase zur Fett- und Amylase zur Kohlenhydratspaltung. Diese Enzyme gelangen mit dem Sekret der Drüse in das Duodenum. Hier werden die Proteasen durch Einwirkung der Enterokinasen aktiv, wie erstmals von PAWLOW und SCHEPOWALNIKOW beschrieben wurde.

Weiter wird in der Drüse Natriumbikarbonat gebildet, das die Aufgabe hat, den sauren Duodenalinhalt zu alkalisieren und damit den Enzymen zu optimalen Reaktionsbedingungen zu verhelfen.

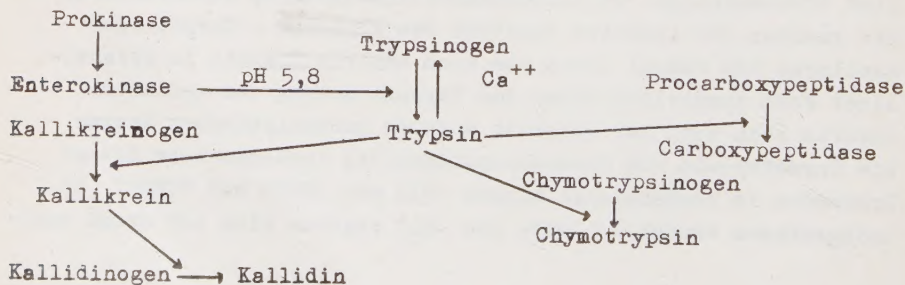
Die proteolytischen Enzyme.

Die eiweißspaltende Wirkung des Pankreassaftes wurde 1857 von CORVISART entdeckt, und 1867 schrieb KUHNE diese Wirkung einem spezifischen Substrat zu, das er Trypsin nannte.

Genaueren Aufschluß über die proteolytischen Enzyme erhielten wir durch die Untersuchungen von NORTHROP und KUNITZ (38), die ihre Untersuchungen an Rinderpankreashomogenaten durchführten. Sie konnten die inaktive Vorstufe des Trypsins - Trypsinogen - isolieren und sowohl diese als auch aktives Trypsin in kristalliner Form darstellen. Neben dem Trypsin gelang den genannten Autoren auch noch der Nachweis anderer proteolytischer Enzyme wie Chymotrypsin und Carboxypeptidase. Das Vorhandensein dieser Proteasen im Duodenalsaft konnte 1933 von ANSON und MIRSKY (3) nachgewiesen werden. Im Laufe der Zeit ergaben sich auf Grund zahl-

reicher Untersuchungen noch Anhaltspunkte für die Existenz weiterer Proteasen (z.B.Elastase) im Pankreas,die jedoch in ihrer Wirkungsweise noch nicht genau analysiert werden konnten. Die Hauptvertreter der proteolytischen Enzyme des Pankreas sind Trypsin,Chymotrypsin und Carboxypeptidase.Wie allen Proteasen ist ihnen als spezifisches Substrat Eiweiß gemeinsam,das sie in Aminosäuren zu spalten vermögen.Sie unterscheiden sich in ihrer Wirkung durch die Art,wie sie ein Eiweißmolekül spalten: Trypsin und Chymotrypsin zählen zu den Endopeptidasen,die Bindungen im Inneren einer Kette spalten;Carboxypeptidase dagegen ist eine Exopeptidase,die endständige Peptidbindungen angreift.

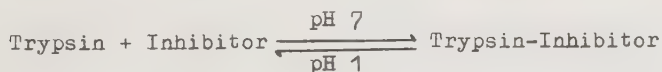
Am eingehendsten untersucht ist von diesen Enzymen die Wirkung des Trypsins.Seine inaktive Vorstufe Trypsinogen wird im Duodenum durch Enterokinase optimal bei pH 5,8 zu Trypsin aktiviert. Einmal aktiv,ist es in der Lage,Trypsinogen autokatalytisch zu aktivieren.Jedoch ist hierzu nach NORTHROP und KUNITZ (38) und HAVERBACK et al.(24) eine bestimmte Konzentration von Kalziumionen erforderlich.Trypsin nimmt als Aktivator anderer Enzyme eine zentrale Stellung ein.Es aktiviert Chymotrypsinogen über verschiedene Vorstufen zu Chymotrypsin.Das Gleiche gilt für die Procarboxypeptidase.Darüberhinaus aktiviert Trypsin im Pankreas gebildetes und mit dem Sekret ausgeschiedenes Kallikreinogen zu Kallikrein (20),das selbst wieder eine Substanz mit Wirkung auf die Peristaltik des Darmes,Kallidinogen (22),zu aktivieren imstande ist.Ein vereinfachtes Reaktionsschema nach GRASSMANN (22) und RICHTERICH (40) veranschaulicht dieses Verhalten:



Der Trypsininhibitor.

NORTHROP und KUNITZ (38) fanden bei ihren Untersuchungen ein Polypeptid, das imstande war, aktives Trypsin zu inaktivieren: den Trypsininhibitor. Weiter wiesen FREY, KRAUT und WERLE 1931 in der Parotis von Rindern einen Inhibitor nach, der das kreislaufaktive Hormon Kallikrein hemmte (20). Es stellte sich dann heraus, daß er daneben auch Trypsin und - wie WERLE et al. (48) 1952 zeigen konnten - Chymotrypsin zu hemmen vermochte. Dieser Kallikrein-Trypsin-Inhibitor⁺ scheint zudem nach neueren Untersuchungen von KRAUT et al. (30, 31, 32) mit dem von NORTHROP und KUNITZ isolierten Inhibitor identisch zu sein. Der Inhibitor findet unterdessen u.a. bei der akuten Pankreatitis (4, 15, 16, 17, 47) und in der Abdominalchirurgie (29) therapeutische Verwendung.

Die Aufklärung der Reaktion zwischen Trypsin und seinem Inhibitor verdanken wir vor allem NORTHROP und KUNITZ (33). Danach reagiert Trypsin in Abhängigkeit vom herrschenden pH-Wert folgendermaßen mit dem Inhibitor:



(aktiv)

(inaktiv)

Der Trypsin-Inhibitor-Komplex ist, wie auch KALSER und GROSSMAN (28) nachweisen konnten, durch Ansäuern mit Trichloressigsäure zu spalten. Unter pH 3 sind Trypsin und Inhibitor maximal dissoziiert. Nach diesem Prinzip konnten auch NORTHROP und KUNITZ den Inhibitor in kristalliner Form gewinnen. Er erwies sich als säurestabil und hitzeresistent.

Amylase und Lipase.

Über das Verhalten der Amylase und Lipase existiert ein umfangreiches Schrifttum. Wir beschränken uns in diesem Zusammenhang nur auf einen kurzen Überblick. Die Pankreasamylase spaltet Polysaccha-

+ von der Firma Bayer, Leverkusen, unter dem Namen Transylol hergestellt.

ride bis zur Maltose. Sie wird durch Salze, besonders durch NaCl, aktiviert und hat ein Reaktionsoptimum bei pH 6,9 wenn Stärke als Substrat verwandt wird. Die Pankreaslipase vermag Fette in die einzelnen Fettsäuren und Glycerin zu spalten und ist in ihrer Wirkung sehr von Begleitsubstanzen wie Galle und verschiedenen Salzen (z.B. Kalziumsalze) abhängig. Ihr pH-Optimum liegt bei 8.

Einflüsse auf die Enzyme im Duodenum.

Eine Anzahl physiologischer Faktoren beeinflussen das Verhalten und die Wirksamkeit der Enzyme im Duodenum.

So ist seit langem bekannt, daß durch Gallebeimengung zum Duodenalinhalt während der Verdauung eine Emulgierung der Fette eintritt, die dadurch von der Lipase wesentlich leichter in die einzelnen Fettsäuren gespalten werden können.

Ferner weisen Untersuchungen von HELLER (25) und FREUDENBERG (19) auf einen Einfluß der Galle auch auf die Wirkung des Trypsins hin, dessen optimaler pH-Bereich (7,5 - 8,5) durch Anwesenheit von Galle zur sauren Seite verschoben werden kann. Dies dürfte bei den im oberen Duodenum herrschenden pH-Werten von etwa 6,0 (OTTENJANN, 39) von großer Bedeutung sein. Weiterhin konnten die genannten Autoren in vitro nachweisen, daß die Trypsinwirkung im schwach sauren Bereich eine Steigerung durch Galle erfährt, im neutralen Bereich unbeeinflusst bleibt und im Alkalischen vermindert wird. Dieser Wirkungsmechanismus wird folgendermaßen erklärt: abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration erhöhe Galle die Dispersität des Darminhaltes, wodurch gewissermaßen die Oberfläche der zu verdauenden Eiweißkörper vergrößert werde. Daraus resultiere eine bessere Angriffsmöglichkeit für das Trypsin, die dessen Wirkungssteigerung zur Folge habe.

Saurer Magensaft mindert die Wirkung der Pankreasproteasen, schafft jedoch den Magenproteasen Pepsin und Kathepsin optimale Verdauungsbedingungen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die Eiweißspaltung im Duodenum auch noch von diesen Magenproteasen vorgenommen wird, während die Pankreasproteasen möglicherweise erst im Jejunum zur vollen Wirksamkeit gelangen.

Zu erwähnen ist schließlich noch der Einfluß verschiedener Salze

bzw. Ionen auf die Aktivität von Enzymen, die nach LANSBERG (35) und SCHÖN et al. (43) besonders beim Trypsin durch Kalziumionen gesteigert werden kann. Andere Ionen wie Mg^{++} , Ba^{++} u.a. zeigen ein ähnliches Verhalten.

In Arbeiten von COPE et al. (11) und HAYERBACK (24) wird seit einiger Zeit diese Wirkung der Kalziumionen mit dem Krankheitsbild des Hyperparathyreoidismus in Zusammenhang gebracht, da hierbei bekanntermaßen als Komplikation relativ häufig eine Pankreatitis zu beobachten ist.

Die Sekretionshormone.

Im Jahre 1902 wurde von BAILLIS und SPARLING (6) in der Duodenalschleimhaut das Hormon Sekretin entdeckt, das - freigesetzt durch chemische Reize (z.B. HCl) - in der Lage ist, die Sekretion des Pankreas erheblich zu stimulieren. Nach BABKIN (5) kommt es dabei vorwiegend zu einer Steigerung der sogenannten hydrokinetischen Funktion der Drüse, die neben einer erhöhten Sekretmenge auch eine vermehrte Bikarbonatausscheidung zur Folge hat. Als weiteres Hormon mit einer Wirkung auf die Sekretion des Pankreas wurde 1943 von HARPER und RAPER (23) das Pankreozymin erkannt, das gleich dem Sekretin in der Duodenalschleimhaut gebildet und durch adäquaten Reiz freigesetzt wird. Es stimuliert die sogenannte ekbolische Funktion, die zu einer vermehrten Enzymabgabe führt.

Der Sekretintest.

Durch intravenöse Injektion eines Sekretinpräparates wurde erstmals 1926 von CHIRAY, MERCIER und SALMON (10) eine Pankreassekretion beim Menschen provoziert, wobei das Sekret mittels Duodenalsonde aufgefangen werden konnte. Von LAGERLÖF (34), DREILING (13) u.a. wurde die nun als Sekretintest bezeichnete Pankreasfunktionsprüfung weiter modifiziert und mit Hilfe des von JORPES (27) gereinigt dargestellten Sekretinpräparates für klinische Zwecke verwendbar gemacht. Der Test ist heute für Sekretionsstudien am Pankreas als günstigste Methode anzusehen.

Fragestellung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Verhalten der Sekret -, Bikarbonat - und Enzymausscheidung nach sekretorischer Reizung des Pankreas mit Sekretin und auch Pankreozymin bei Pankreasgesunden und - kranken. Weiterhin sollte geprüft werden, ob eine Möglichkeit zur Bestimmung des mit dem Pankreassaft ausgeschiedenen Trypsininhibitors im Duodenalsaft besteht.

Als Beitrag zur Physiologie der exkretorischen Pankreasfunktion erschien es ferner von Interesse, den Einfluß von Gallesekretion, Magensaft und Kalziumionen auf das Verhalten der Enzyme und des Trypsininhibitors im Duodenalsaft zu untersuchen.

METHODIK

=====

I. Durchführung der Sekretin - und Pankreozymin teste.

Mit der von AGREN und LAGERLÖF (1) entwickelten Doppelsonde ist es möglich, Duodenalinhalt und Magensekret weitgehend getrennt aufzufangen. Nach röntgenologischer Kontrolle der Sondenlage wurden Magen - und Duodenalanteil mit einer Membransaugpumpe bei konstantem Unterdruck von 150 mm H₂O getrennt abgesaugt. Die Säfte wurden in eisgekuhlten Kolben aufgefangen und nach Abschluß der Teste sofort verarbeitet. Zunächst wurde eine Nüchternfraktion von 20 min. Dauer gewonnen, anschließend 1 E Sekretin⁺ pro kg Körpergewicht i.v. injiziert und danach fünf 20 min. Fraktionen aufgefangen. Anschließend wurde meist mit Sekretin oder Pankreozymin⁺⁺ ein erneuter Reiz gesetzt und danach vier weitere 20 min. Fraktionen aufgefangen.

+ Sekretin von der Firma Vitrum, Stockholm

++ Pankreozymin von der Firma Boots Ltd., Nottingham, England

II. Im Duodenalsaft vorgenommene Bestimmungen.

- 1) Messen der S a f t m e n g e
- 2) Bestimmung des pH-Wertes mittels pH-Meter
- 3) B i k a r b o n a t bestimmung nach SCRIBNER und CAILLUETTE (46) bei 1:4 verdünntem Duodenalsaft
- 4) photometrische Bestimmung des Gesamt b i l l i r u b i n s nach JENDRASSIK (26)
- 5) photometrische Bestimmung der K a l z i u m konzentration
- 6) Enzymbestimmungen:
 - a) A m y l a s e nach SCHÖN et al. (45)
 - b) L i p a s e nach SCHÖN et al. (45). Bei dieser Bestimmung, die in 1:10 000 verdünnten Säften vorgenommen wird, erwies sich bei hohen Konzentrationen die Farbe nach Ausschütteln mit Natriumsulfat als nicht stabil. Weil dadurch niedrigere Endwerte resultierten, erschien es uns zweckmäßig, das Wasser aus der Farblösung nicht mit Natriumsulfat sondern durch Zentrifugieren zu entfernen. Danach trat eine größere Farbstabilität ein.
 - c) Gesamt p r o t e a s e n nach ANSON und MIRSKY (2,3) in der von RICK (41) angegebenen Modifikation. Für jede Bestimmung wurde eine neue Trypsineichkurve mit kristallinem Trypsin⁺ angelegt.
 - d) T r y p s i n nach NACHLASS und SELIGMAN (37) in den Modifikationen von BRATTON und MARSHALL (9) und SCHÖN et al. (44) mit dem für Trypsin spezifischen Substrat N-Benzoyl-DL-Arginin-beta-Naphthylamid Hydrochl. von RIEDEL und WUNSCH (42). Als Farbreagenz wurde N-(1-Naphthyl)-äthylendiamindihydrochl. verwandt, da hierbei die Adsorption der Farbe an das Eiweiß keine wesentliche Rolle spielt (44). Entgegen dem Vorgehen von SCHÖN wurde eine Ansatzmenge von 0,5 ml Saft gewählt, da erst bei dieser Menge ein optimaler Messbereich erlangt wird.
 - e) Die Bestimmung des Trypsininhibitors im Duodenalsaft wurde

+ zweimal kristallisiertes Trypsin von der Firma Worthington, USA

im Wesentlichen nach der von SCHÖN et al. (44) beschriebenen Methode zur Bestimmung des Trypsininhibitors im Serum vorgenommen. Im Prinzip handelt es sich hierbei um eine Aktivitätsbestimmung des Trypsins: 1 ml einer Lösung, die 100 gamma kristallines Trypsin pro ml enthält, zur Stabilisierung versetzt mit 0,01 ml 0,1 n HCl, wird zum Duodenalsaft gegeben. Während einer Vorinkubationszeit kann sich die Hemmwirkung des Saftes auf das kristalline Trypsin auswirken. Das restliche aktiv gebliebene Trypsin wird anschließend bestimmt. Die Hemmwirkung pro ml Saft wird angegeben in gamma gehemmtem kristallinen Trypsin. Die Aktivität der 100 gamma Trypsinlösung wurde für jede Versuchsreihe neu bestimmt und in den Tabellen als 100 gamma Trypsinwert angegeben.

Die Maßangaben der Enzymbestimmungen beziehen sich auf die jeweils pro Zeiteinheit und Temperatur umgesetzten Substratmengen.

Sämtliche photometrischen Bestimmungen wurden aus meßtechnischen Gründen bei 0,5 cm Küvettschichtdicke im ZEISS-Photometer ELKO III gemessen.

- f) Für vergleichende Untersuchungen wurde Trypsin* außerdem nach der von ROMAN u. Mitarb. (49) angegebenen Methode bestimmt. Hierbei wird Benzoyl-DL-arginin-p-nitro-anilid hydrochlorid (BAPA) als Substrat verwandt.

Untersuchungen über die Hemmung von Trypsin durch menschlichen Duodenalsaft.

I. Bestimmung im nativen Duodenalsaft nach Sekretinreiz.

Für eine Bestimmung der Hemmung des nach Sekretinreiz gewonnenen Duodenalsaftes erwies es sich zunächst als notwendig, optimale Vorinkubationsbedingungen zu finden.

In einer Versuchsreihe wurden 0,05 ml Duodenalsaft verschieden lange mit 1 ml der 100 gamma Trypsinlösung im Wasserbad bei 37°C vorinkubiert. Es stellte sich heraus (Tab.1), daß bereits nach 2 min. 75% des vorgelegten Trypsins gehemmt waren und nach 10 min. ein maximaler Umsatz stattgefunden hatte.

min.	2	4	6	8	10	60
gamma gehemmt Trypsin	74	84	88	88	90	90

Tab.1 Hemmung von 0,05 ml Duodenalsaft gegenüber 97 gamma kristallinem Trypsin bei verschiedenen Vorinkubationszeiten und einer Inkubationstemperatur von 37°C.

Um zu sehen, ob bei maximalem Umsatz stöchiometrische Beziehungen zwischen vorgelegter Saftmenge und kristallinem Trypsin zu finden waren, wurden steigende Saftmengen zum Ansatz verwandt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Dabei zeigt sich, daß die Hemmwirkung des Saftes in der von uns verwandten Methodik noch bei kleinsten Ansatzmengen zu hoch ist, um eine brauchbare Bestimmung zu ermöglichen.

Ansatz ml	100 gamma Trypsinwert ⁺	gamma gehemmtes Trypsin/Ansatz
0,100	102	91
0,080	110	98
0,050	103	92
0,040	110	93
0,025	101	92
0,020	110	84

Tab.2 Hemmwirkung von verschiedenen Mengen Duodenalsaft gegenüber kristallinem Trypsin. Vorinkubation 10 min. bei 37° C.

Im Folgenden wurde daher versucht, durch Verdünnung in einen Bereich zu gelangen, der stöchiometrische Beziehungen erkennen läßt. Zunächst wurde der Saft 1:2 verdünnt und verschiedene Ansatzmengen verwandt (Tab.3).

Ansatz ml	Verdün- nung	100 gamma Trypsinwert ⁺	gamma gehemmtes Trypsin ⁺⁺
0,02	1:2	113	0
0,04	1:2	113	67
0,06	1:2	113	100
0,08	1:2	113	105

Tab.3 Hemmwirkung verschiedener Ansatzmengen Duodenalsaft, die 1:2 verdünnt wurden.

Da sich hieraus nur eine grobe Abstufung ergibt, verdünnten wir gleiche Ansatzmengen in Stufen (Tab.4).

Auch hier waren keine verwendbaren stöchiometrischen Beziehungen zu finden.

+ s. Methodik

++ d.h. durch den Ansatz gehemmtes kristallines Trypsin

Ansatz ml	Verdün- nung	gamma Hemg. ⁺	Ansatz ml	Verdün- nung	gamma Hemg.	Ansatz ml	Verdün- nung	gamma Hemg.
0,1	-	112	0,05	-	87	0,025	-	75
0,1	1:2	123	0,05	1:2	86	0,025	1:2	0
0,1	1:3	100	0,05	1:3	14	0,025	1:3	0
0,1	1:4	14	0,05	1:4	0	0,025	1:4	0
0,1	1:5	0	0,05	1:5	0	0,025	1:5	0
Saft I 100 gamma Trypsin entsprechen 123 gamma			Saft II 100 gamma der Trypsinlösung entsprechen 111 gamma Aktivität					

Tab.4 Hemmwirkung gleicher Ansatzmengen nativen Duodenalsaftes bei verschiedenen Verdünnungsstufen.

Bei reinem, durch Drainage gewonnenem Pankreassekret, das keinerlei Beimengungen von Galle oder Duodenalsaft enthielt und bei dem die proteolytischen Enzyme in inaktiven Vorstufen vorliegen, wurde ein Ansatz von 0,025 ml in gleicher Weise verdünnt (Tab.5). Beim Originalansatz erwies sich die Konzentration des Inhibitors als zu hoch im Verhältnis zum vorgelegten Trypsin, so daß ein zu niedriger Endwert vorgetäuscht wird. Bei einer Verdünnung von 1:4 wird der optimale Meßbereich unterschritten, woraus ebenfalls ein zu niedriger Endwert resultiert. Dagegen ist ersichtlich, daß die Verdünnungswerte von 1:2 und 1:3 mit dem Null-Wert eine Gerade bilden (Abb.1) und daher etwa den gleichen Endwert ergeben. Es ist hier also eine Stöchiometrie, wenn auch in einem schmalen Bereich nachzuweisen.

Ansatz ml	Verdün- nung	100 gamma ⁺ Trypsinwert	gamma gehemmtes Tryps./Ansatz	Hemmung gamma/ml	Mittel- wert
0,025	-	88	70	2800	5720
0,025	1:2	88	74	5920	
0,025	1:3	88	46	5520	
0,025	1:4	88	26	4160	

Tab.5 Hemmwirkung eines reinen Pankreassekretes in verschiedenen Verdünnungen bei gleicher Ansatzmenge.

+ s. Methodik

++ d.h. durch den Ansatz gehemmtes Kristallines Trypsin

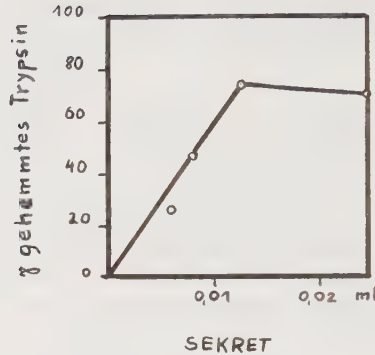


Abb. 1 Stöchiometrische Beziehungen der Hemmwirkung von 0,025 ml reinem Pankreassekret unverdünnt und 1:2, 1:3 und 1:4 verdünnt gegenüber kristallinem Trypsin.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die Begleitsubstanzen des durch Sekretintest gewonnenen Duodenalsaftes (Galle, Duodenalsekret, Magensaft) und insbesondere die hier in aktiver Form vorliegenden Enzyme die Bestimmung des Inhibitors, auch bei Verdünnung, stören. Es mußte daher ein anderer Weg beschritten werden, um die Hemmwirkung im intraduodenal gewonnenen Saft zu erfassen.

II. Bestimmung im gekochten Duodenalsaft.

Von kristallisierten Trypsininhibitoren und gereinigten Präparaten ist die Thermostabilität bekannt. Andererseits werden durch Hitzeeinwirkung - möglicherweise abhängig vom pH-Wert - die proteolytischen Enzyme und ihre Vorstufen zerstört. Es schien aus diesen Gründen zweckmäßig, den Duodenalsaft zu kochen, um die Hemmwirkung nach Ausschaltung wesentlicher Störfaktoren selektiv prüfen zu können. Zur Kontrolle wurden gekochte Säfte auf ihre proteolytische und tryptische Aktivität untersucht (Tab. 6).

Tryptische Aktivität nach BRATTON-MARSHALL ⁺				
Ansatz ml	gamma/ml ^x Aktivität <u>vor</u> Kochen	gamma/ml ^x Aktivität <u>nach</u> Koch	gamma/ml ^x Aktivität nach Kochen + 0,5 ml En- terokinase	gamma/ml ^x Aktivität nach Kochen + 0,3 ml Enterokinase + 0,2 ml 0,25 m CaCl ₂
0,5	44	0	0	0,5
Proteolytische Aktivität nach ANSON ⁺				
0,1	49	0	0	0

Tab.6 Prüfung der proteolytischen und tryptischen Aktivität und Aktivierbarkeit durch kristalline Enterokinase⁺⁺ im gekochten Duodenalsaft.

Selbst nach Zusatz von gereinigter Enterokinase war keine Aktivität bzw. Aktivierbarkeit mehr nachweisbar.

Für die Hemmbestimmung wurde folgendes Vorgehen gewählt:

1 ml Duodenalsaft wurde 20 min.gekocht und anschließend im Wasserbad abgekühlt.Danach wurden verschiedene Ansatzmengen entnommen und bestimmt.

1) Inkubationszeit: In einer Versuchsreihe wurde bei verschiedenen langer Vorinkubation das Reaktionsoptimum für gekochten Duodenalsaft ermittelt.Zum Vergleich wurde das Verhalten des reinen Pankreassekretes und des Trasylols studiert (Tab.7).

	100 gamma Trypsinwert ⁺	2	4	6	8	10	30	60	min.Vor- inkub.
40 E Trasylol	111	41	37	37	40	45	35	37	gamma gehemm- tes Trypsin
Saft gekocht	105	19	24	29	35	61	82	89	
reines Sekret nativ	111	17	29	36	47	58	98	101	

Tab.7 Hemmung von gekochtem Duodenalsaft nach Sekretintest,reinem Pankreassekret durch Drainage gewonnen und Trasylol bei verschiedenen Vorinkubationszeiten bei 37° C.

+ / ++ vergl.Fußnote Seite 11

x Die Maßangaben beziehen sich auf die pro Zeiteinheit und Temperatur umgesetzten Substratmengen.

Es stellte sich heraus, daß gereinigter Inhibitor (Trasylol) eine relativ rasche Reaktion mit dem kristallinen Trypsin eingeht. Natives, reines Pankressekret dagegen reagiert wesentlich langsamer, sein Optimum liegt bei ca 30 min. Das Gleiche gilt für gekochten Duodenalsaft. Um in einen günstigen Meßbereich zu gelangen, wurde der gekochte Saft bei unseren Bestimmungen nur 10 min. Vorinkubiert. Dabei stellte sich heraus, daß vergleichende Untersuchungen bei dieser Inkubationszeit durchaus möglich sind.

2) Inkubationstemperatur: Am Beispiel eines Sekretintestes stellten wir einen Vergleich an zwischen einer Inkubationstemperatur von 37° und einer solchen von 25° C. Es sollte dabei untersucht werden, ob bei einer verminderten Inkubationstemperatur noch Feinabstufungen der Hemmwirkung erkennbar sind. Wir verglichen daher bei den einzelnen 20 min. Fraktionen nach Sekretinreiz die Hemmwirkung von gekochtem Saft, der 10 min. sowohl bei 25° als auch bei 37° C vorinkubiert wurde. Nativer Saft bei 37° wurde nicht bestimmt, da wir vorher feststellten, daß hier die Vorlage des kristallinen Trypsins nicht ausreicht, die Hemmung zu erfassen. Höhere Trypsinvorlagen sind aus methodischen Gründen nicht zu empfehlen (Tab.8).

min. nach Sekretin	Gekochter Saft		Nativer Saft
	Hemmung in gamma/ml*		Hemmung in gamma/ml*
	37°	25°	25°
20	2320	170	370
40	1960	150	360
60	2480	140	330
80	1560	80	330
100	880	80	210

Tab.8 Vergleich der Hemmwirkungen von gekochtem und nativem Duodenalsaft gegenüber 96 gamma kristallinem Trypsin bei verschiedenen Vorinkubationstemperaturen.

* vergl. Fußnote Seite 13

Es zeigt sich beim Vergleich der Ergebnisse, daß bei 25° C sowohl bei gekochtem als auch bei nativem Saft eine Verminderung der gemessenen Hemmung eintritt. Dadurch sind feinere Unterschiede während des Sekretintestes nicht mehr erfaßbar. Daher wurde der Saft bei den Sekretionsuntersuchungen 10 min. bei 37° C vorinkubiert.

3) Stöchiometrische Beziehungen: Unter diesen Inkubationsbedingungen untersuchten wir nun, ob die im gekochten Saft meßbare Hemmung sich stöchiometrisch zum kristallinen Trypsin verhält. Zunächst zeigte sich bei verschiedenen Ansatzmengen und Verdünnungen (Tab.9), daß man bei einem Ansatz von 0,025 ml und 0,05 ml 1:2 verdünntem Saft (Blutzuckerpipette) die günstigsten Ergebnisse erhält.

Aber auch steigende Ansatzmengen (Abb.2) ließen am Beispiel von 3 Säften in einem Bereich von etwa 0,02 - 0,04 ml stöchiometrische Beziehungen erkennen.

Um die Abhängigkeit der Hemmwirkung im Verlaufe von Sekretintesten zu untersuchen, wurden daher Ansätze von 0,025 ml und 0,05 ml 1:2 verdünnten Saftes herangezogen.

Vergleicht man die Hemmwirkung im nativen Duodenalsaft mit nativem, reinen Pankreassekret, fällt nach Kochen eine deutliche Verminderung der Hemmwirkung auf, die, grob gesehen, etwa 2/3 beträgt.

	Ansatz ml	Verdün- nung	100 gamma ⁺ Trypsinwert	gamma/Ansatz geh.Trypsin ⁺⁺	gamma/ml geh.Tryp. ⁺⁺	Mittel- wert
Saft I	0,025	-	103	65	2600	2570
	0,025	1:2	103	35	2800	
	0,040	1:2	103	46	2300	
Saft II	0,025	-	100	62	2480	2465
	0,040	1:2	100	49	2450	
Saft III	0,025	-	104	72	2880	2880
	0,050	1:2	104	72	2880	

Tab.9 Hemmwirkung von gekochtem Duodenalsaft gegenüber kristallinem Trypsin bei verschiedenen Ansatzmengen und Verdünnungen.

⁺ s. Methodik

⁺⁺ s. Fußnote Seite 13

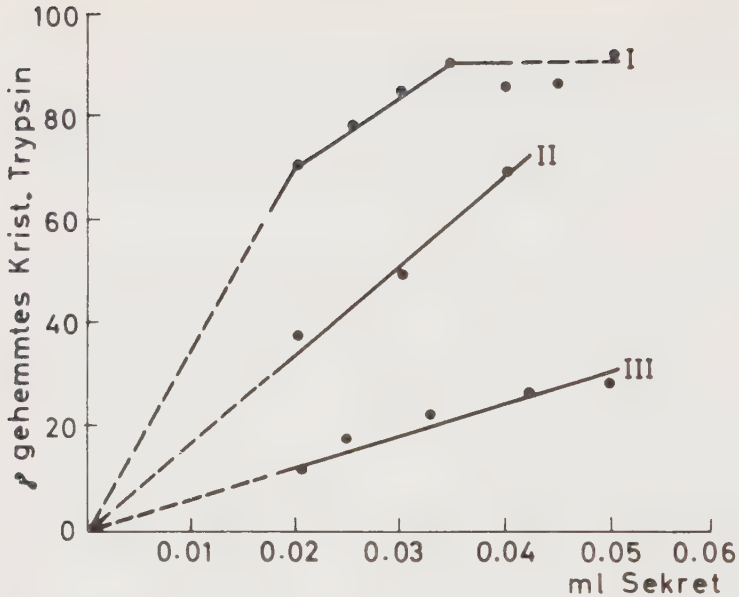


Abb.2 Stöchiometrische Beziehungen der Hemmwirkung von verschiedenen gekochten Duodenalsäften unverdünnt bei steigenden Ansatzmengen.

III. Der Einfluß von Säure auf die Hemmwirkung.

Bei der Bestimmung der Hemmung in unmittelbar vor dem Sekretintest gewonnenen Nüchternsekreten (Basalsekretion), die durch hinzugeflossenen Magensaft pH-Schwankungen von 1,5 - 7,5 aufwiesen, fiel auf, daß sie bei fallendem pH-Wert gemindert wurde. Stellt man die erhaltene Hemmung nach pH-Gruppen zusammen, so ergibt sich die in Abb.3 dargestellte Abhängigkeit.

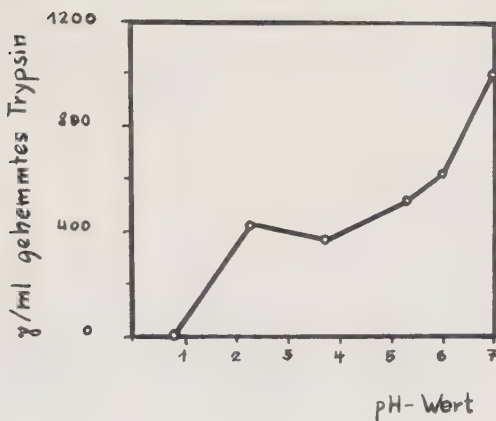


Abb.3 Abhängigkeit der Hemmwirkung des gekochten Duodenalsaftes vom pH-Wert. Die einzelnen Punkte stellen Mittelwerte aus folgenden pH-Gruppen dar: 0 - 1,5; 1,6 - 3,0; 3,1 - 4,5; 4,6 - 6,0; 6,1 - 6,5; 6,6 - 7,5.

IV. Prüfung der Hemmwirkung mit dem Substrat BAPA⁺.

Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Hemmwirkung des Duodenalsaftes gegenüber kristallinem Trypsin substratspezifisch ist, prüften wir sie bei Verwendung von BAPA (s. Methodik) und verglichen die Ergebnisse mit denen, die wir bei Verwendung von BANA (s. Methodik) fanden.

Frische, gallefreie Duodenalsäfte, nach Sekretinreiz gewonnen, wurden bei unterschiedlicher Temperatur verschieden lange mit kristallinem Trypsin und TRIS-Puffer (pH 7,8 ohne Kalziumzusatz) vorinkubiert.

⁺ Benzoyl-D-L-arginin-p-nitro anilid hydrochlor.

Trypt. Aktivität (Δ E)	bei 25° C nach				bei 37° C nach			
	1	10	20	30 min.	1	10	20	30 min.
1) des Duodenalsaftes	33	33	32	30	38	34	27	22
2) des krist. Trypsins	32	33	32	27	37	32	23	16
3) geforderte Aktivität aus 1) + 2)	65	66	64	57	75	66	50	38
4) gemessene Aktivität des Gem. von 1) und 2)	67	66	64	56	77	56	39	26

Tab.10 Vergleich der Hemmwirkung von Duodenalsaft gegenüber kristallinem Trypsin bei 25° und 37° C und verschieden langer Vorinkubation.

Wie aus Tab.10 zu ersehen, addiert sich bei 25°C die tryptische Aktivität des Saftes und die des kristallinen Trypsins vollständig, ohne daß eine Hemmwirkung eintritt. Sowohl der Saft als auch das kristalline Trypsin selbst zeigen bei dieser Temperatur bei 30 Minuten einen geringen Aktivitätsverlust.

Beträgt die Vorinkubationstemperatur dagegen 37° C, so ist neben einem relativ hohen Verlust der Eigenaktivität von Saft und Trypsinlösung nach 30 Minuten keine Addition, vielmehr eine deutliche Minderung der erwarteten Aktivität zu finden. Während nach 1 Minute noch keine Hemmwirkung erkennbar ist, ist nach 30 Minuten fast das gesamte vorgelegte kristalline Trypsin verbraucht.

Obwohl nach diesen Ergebnissen ein Ioneneffekt für die Hemmwirkung als nicht wahrscheinlich angesehen werden muß, versuchten wir Duodenalsäfte und ließen die zurückbleibenden Salze in analoger Weise auf kristallines Trypsin einwirken. Erwartungsgemäß trat keine Hemmung auf.

Untersuchten wir entsprechend dem auf Seite 17 beschriebenen Vorgehen vier 20 min. Fraktionen nach Sekretinreiz auf ihre Hemmwirkung, so fanden wir auch bei Verwendung von BAPA ein unterschiedliches Ausmaß der Hemmwirkung unter den einzelnen Fraktionen.

Die Sekretion des Pankreas nach Sekretin - und Pankreozyminreiz.

I. Sekretinreiz.

Um einen Einblick in den normalen Sekretionsmechanismus des Pankreas nach Sekretinreiz zu gewinnen, wurden 36 Sekretinteste von Patienten ohne Pankreasaaffektionen aufgeschlüsselt. Die Durchführung der Teste geschah nach dem bei der Methodik beschriebenen Vorgehen. Bei 21 Patienten wurden 120 min. nach dem ersten Reiz nochmals 1 E Sekretin/kg Körpergewicht i.v. injiziert und erneut 4 Fraktionen gewonnen.

Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der Enzyme:

Wie bereits beschrieben, ist der Trypsininhibitor säureempfindlich. Um zu prüfen, wie stark die einzelnen Enzyme vom pH des Duodenalsaftes abhängig sind, wurden in Basalsekreten, welche pH-Schwankungen von 1,0 - 7,5 aufwiesen, die Enzyme bestimmt. Die erhaltenen Aktivitäten wurden nach pH-Gruppen zusammengestellt und die Mittelwerte errechnet. Zuvor wurden alle Säfte mit 0,1 n NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 gebracht, um die Bestimmungen nicht zu stören.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, sinken bei steigender Acidität alle Enzymaktivitäten ab. Auch nachträgliches Alkalisieren ändert hieran nichts. Zur Ermittlung der Basalwerte konnten daher nur Säfte mit einem Mindest-pH von 6,0 - für die Bestimmung des Bikarbonates von 7,0 verwandt werden.

Nach Sekretinreiz waren die Säfte jedoch meist alkalisch, wie aus den Mittelwerten der Tab. 11 hervorgeht.

Sekretionsmechanismus nach Sekretinreiz:

In Abb. 5 sind die Enzymkonzentrationen der 20 min. Fraktionen nach Reiz in Form von Sekretionskurven dargestellt, die auf die entsprechenden Konzentrationen der Basalsekretion bezogen sind. Nach Sekretinreiz kommt es zu dem bekannten Anstieg von Sekretmenge und Bikarbonatkonzentration. Bemerkenswerterweise zeigt die

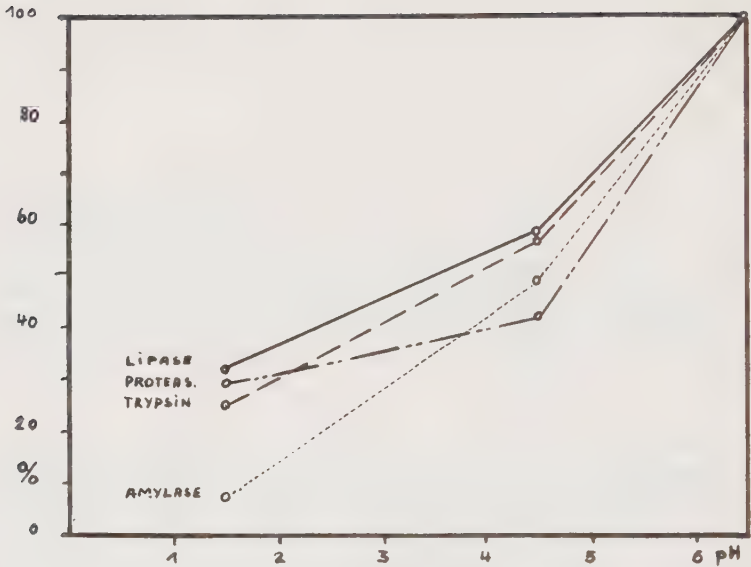


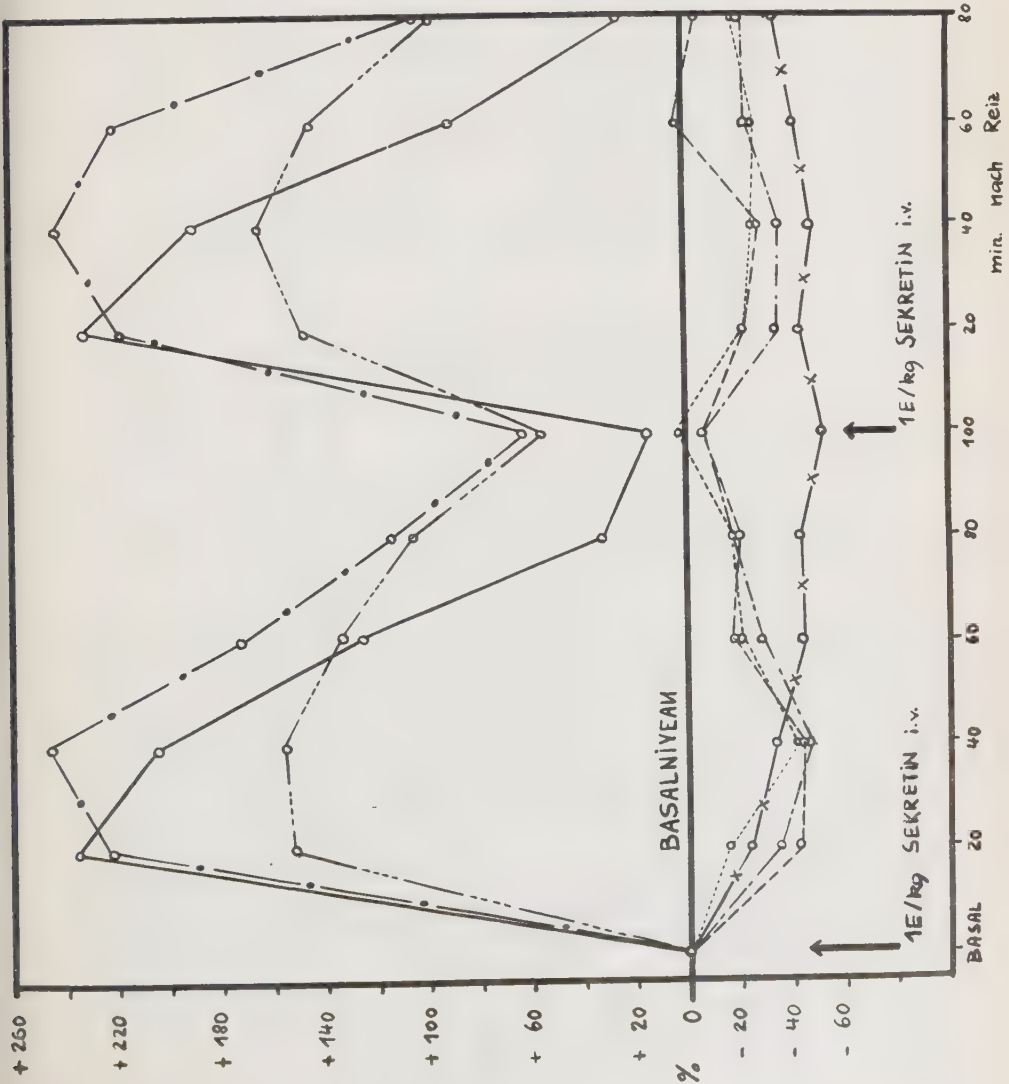
Abb.4 Abhängigkeit der Enzymaktivitäten vom pH-Wert des Duodenalsaftes. Die Punkte stellen Mittelwerte aus folgenden pH-Gruppen dar: 0 - 3,0; 3,1 - 6,0; über 6,0. (Vergleiche auch Tab.A im Anhang).

Hemmwirkung der Säfte ein gleichsinniges Verhalten, während die Enzymkonzentrationen zunächst unter das Basalniveau absinken, um nach Abklingen des Reizes - mit Ausnahme der Lipase - dieses wieder zu erreichen. Die Saftmenge geht nach 100 min. wieder zum Basalwert zurück, während die Bikarbonatkonzentration noch erhöht bleibt. Nach dem zweiten Sekretinreiz ergibt sich annähernd das gleiche Bild, jedoch ist der Konzentrationsabfall der Enzyme etwas geringer. Die Zahlenangaben der Mittelwerte sind aus Tab.11 zu ersehen.

— Sekret
 —•— Hemmwirkg.
 —...— Bikarbon.
 --- Trypsin
 --- Proteasen
 --- Amylase
 —X— Lipase

Abb.5

Prozentuales Ver-
 halten der Enzym-
 und Bikarbonataus-
 scheidung sowie der
 Hemmwirkung im Duo-
 denalsaft nach Se-
 kretinreiz im Ver-
 gleich zur Saftabga-
 be. Mittelwerte aus
 36 einfachen und 21
 Testen mit doppeltem
 Reiz. Zahlenangaben
 s. Tab. 12



min. nach Sekretinreiz	Basal	20	40	60	80	Zwischen- wert	20	40	60	80
Sekretmenge (ml)	19	64	58	43	25	22	63	55	36	24
Bikarbonat (mVal/l)	42	106	107	98	87	66	104	107	103	83
Hemmwirkg. (Gamma/ml)	740	2390	2560	2020	1590	1210	2350	2530	2360	1520
Trypsin (gamma/ml) ⁺⁺	94	54	53	77	75	88	73	69	97	88
Proteasen (gamma/ml)	560	362	301	402	461	519	363	354	429	444
Amylase (g/ml)	4,4	3,7	2,6	3,5	3,6	4,5	3,4	3,2	3,3	3,5
Lipase (mg/ml)	390	301	257	220	220	190	218	205	225	252
Kalzium (mg%)	4,6	3,4	3,2	3,4	3,6	4,8	2,9	2,9	3,6	3,8
Bilirubin (mg%)	5,0	2,2	2,4	3,2	4,2	8,0	6,4	3,8	3,5	4,7
pH - Wert	6,3	7,3	7,4	7,1	7,3	7,1	7,3	7,3	7,1	6,7

Tab. 11 Mittelwerte aller Bestimmungen ^{+/++} von 36 normalen Sekretintesten mit einfachem Reiz und 21 Testen mit wiederholtem Sekretinreiz.

+ s. Methodik

++ vergl. Fußnote Seite 13

Vermehrte Sekretauusscheidung als Verdünnungsfaktor:

Verdünt man Duodenalsaft in verschiedenen Stufen mit aqua dest. und bestimmt die Enzyme, so läßt sich in vitro nachweisen, daß die Enzymkonzentrationen sich stöchiometrisch entsprechend der jeweiligen Verdünnung ändern (Tab.12).

Ansatz ml	Verdün- nung	gamma Aktivi- tät/Ansatz	gamma Aktivi- tät/ml	Mittel- wert
Proteolytische Aktivität nach ANSON ⁺				
0,1	-	26	260	280
0,1	1:2	14	280	
0,1	1:3	10	300	
0,2	1:2	26	260	
Tryptische Aktivität nach BRATTON-MARSHALL ⁺				
0,5	-	35,0	70	70
0,5	1:2	17,5	70	
0,5	1:3	12,5	75	
1,0	1:2	33,0	66	
Amylase nach SCHÖN in g/ml ⁺				
0,1	-	0,45	4,5	5,1
0,1	1:2	0,25	5,0	
0,1	1:3	0,18	5,4	
0,2	1:2	0,53	5,3	

Tab.12 Verhalten der Aktivität von Proteasen, Trypsin und Amylase bei verschiedenen Verdünnungen und Ansatzmengen des Saftes.

Um zu prüfen, ob ein Verdünnungseffekt in vivo durch die hohe Saftmenge nach Sekretin nachzuweisen ist, verglichen wir Teste, die bei verschiedenen hohen Saftmengen letztlich die gleiche Enzymmenge erbrachten. In Abb.6 sind zwei solcher, auf Grund ihrer Saftmenge gegensätzlicher Teste gegenübergestellt.

Bei Pat.K. war die Saftmenge im Vergleich zu Pat.M. um 50% niedriger, die mittlere Trypsinkonzentration aus 4 Fraktionen dagegen um 60% höher, so daß insgesamt eine etwa gleiche Trypsinmenge sezerniert wurde. Auch bei Berücksichtigung des Körpergewichtes ergab sich der gleiche Endwert. Dieses Beispiel demonstriert, daß eine

⁺ vergleiche Fußnote Seite 13

höhere Saftmenge auch beim Test einen Verdunnungsfaktor für die Enzyme darstellen kann. Es sei jedoch hinzugefügt, daß dieses gewissermaßen regulierende Verhalten keineswegs durchgehend für alle Enzyme während eines Testes gefunden wird.

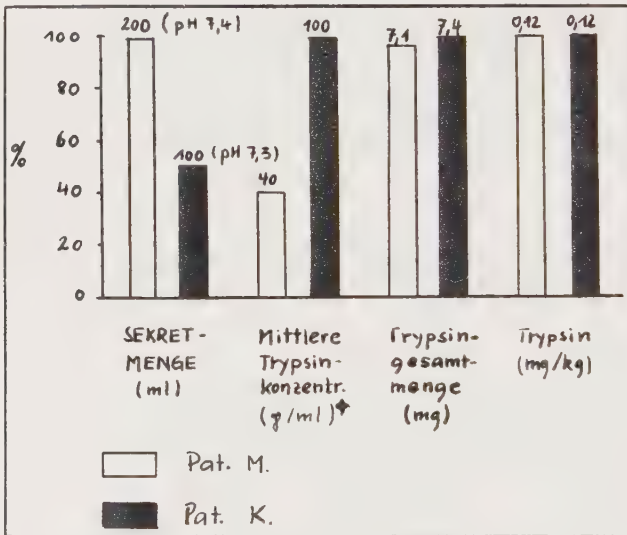


Abb.6 Vergleich der Trypsinausscheidung bei zwei normalen Sekretintesten mit unterschiedlicher Sekretmenge.

Verhalten der Gesamtausscheidungen nach Sekretinreiz:

Da durch die unterschiedliche Saftausscheidung und dem damit verbundenen Verdunnungseffekt die Konzentrationen starken Schwankungen unterliegen, schien es zweckmäßiger, die Gesamtausscheidung bei den einzelnen Bestimmungen zu errechnen, um über die wirkliche Leistung der Drüse nach Sekretinreiz etwas aussagen zu können.

Vorgehen: bei den Normaltesten wurde die basal und nach Reiz sezernierte Gesamtenzymmenge errechnet, indem die gemessene Konzen-

† vergleiche Fußnote Seite 13

tration/ml mit der Saftmenge der jeweiligen Fraktion multipliziert wurde. Stellt man die Sekretionskurven der Gesamtausscheidungen auf, so ergibt sich als Reizantwort auf Sekretin ein anderes Bild: Abb. 7

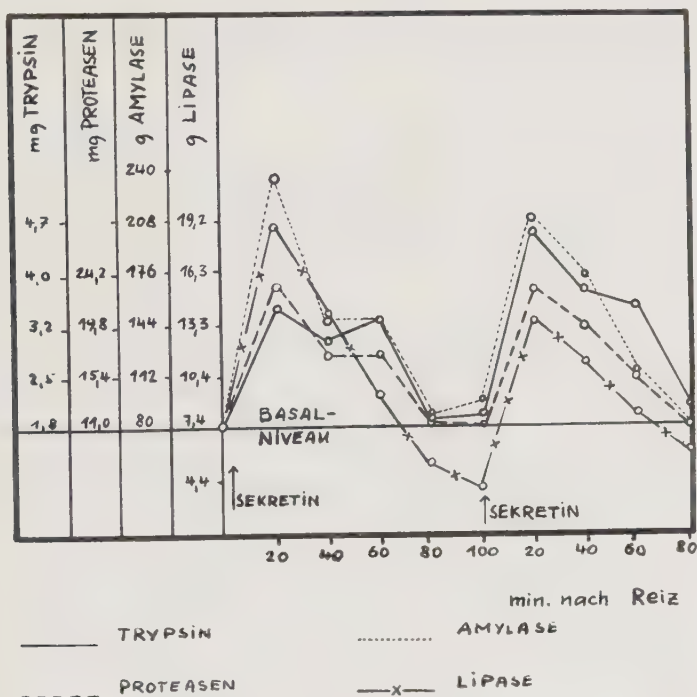


Abb. 7 Verhalten der Enzymgesamtausscheidung⁺ nach Sekretinreiz, bezogen auf die Basalsekretion. Mittelwerte aus 36 einfachen und 21 Testen mit doppeltem Reiz. Vergleiche auch Tab. B im Anhang.

Eindeutig ist nun ein Anstieg der sezernierten Enzymmengen zu erkennen, der nach 20 min. ein Maximum erreicht, um dann allmählich wieder zur Höhe der Basalsekretion abzufallen, die erst nach 80 min.

⁺ vergleiche Fußnote Seite 13

wieder erreicht wird. Nach dem zweiten Sekretinreiz findet man ein sehr ähnliches Bild.

Es läßt sich durch die folgende Überlegung nachweisen, daß die Konzentrationen der Enzyme nach Sekretin immer noch höher liegen als entsprechend der Verdünnung bei Berücksichtigung der gesteigerten Saftmenge zu erwarten gewesen wäre.

Betrachtet man die Basalwerte der Ruhesekretion der Drüse, so ergibt sich nach Reiz durch die gesteigerte Saftmenge für jede Fraktion ein Verdünnungsfaktor. Verrechnet man die einzelnen Verdünnungsfaktoren mit der Enzymkonzentration der Basalsekretion, so erhält man eine Kurve von Enzymkonzentrationen, die gemäß der Verdünnung erwartet werden müßten, falls durch den Reiz keine Änderung oder Abweichung von der basalen Enzymsekretion aufgetreten wäre.

Am Beispiel des Trypsins ist aus Abb.8 zu ersehen, daß die Kurve der gemessenen Konzentrationen höher liegt als die der errechneten. Da die Saftmenge nach 80 - 120 min. wieder nahezu den Spiegel der Basalsekretion erreicht, entsprechen sich hier die gemessenen und errechneten Konzentrationen weitgehend. Nach erneutem Sekretinreiz findet man erwartungsgemäß ein ähnliches Bild wie nach dem ersten Reiz.

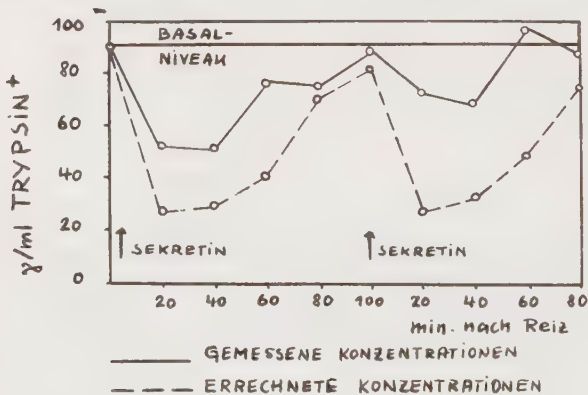


Abb.8 Vergleich der gemessenen und der durch Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechneten Trypsinkonzentrationen jeder Fraktion nach Sekretinreiz.

⁺ vergleiche Fußnote Seite 13

Steigerte der Sekretinreiz die Enzymabgabe nicht, so müßten die gemessenen und errechneten Konzentrationen übereinstimmen. Es kann daher gefolgert werden, daß der Reiz neben einer Steigerung der Saftmenge und des Bikarbonates auch zu höheren Enzymkonzentrationen - bezogen auf das Basalniveau - führt, die jedoch wegen der starken Verdünnung unter dem Niveau der basalen Sekretion liegen.

II. Pankreozyminreiz.

Im Folgenden wurde bei 8 Patienten statt des zweiten Sekretinreizes ein Reiz durch Injektion von 1 E Pankreozymin/kg Körpergewicht i.v. gesetzt, um den Unterschied zwischen Sekretin- und Pankreozyminwirkung zu untersuchen.

Sekretionsmechanismus nach Pankreozyminreiz:

Aus den Sekretionskurven (Abb.9) ist hier - bei wesentlich geringerer Saftmenge - ein Anstieg der Enzymkonzentration über das Niveau der Basalsekretion zu erkennen.

Mit Ausnahme der Lipase wird nach 20 min. ein Maximum erreicht. Saftmenge, Amylase, Trypsin und Hemmwirkung sinken schon während der folgenden 20 min. zur Basalhöhe ab, während Lipase, Proteasen und Bikarbonat noch erhöht bleiben. Beim Vergleich zum Sekretinreiz zeigt sich ferner, daß weniger Sekret ausgeschieden wird, während die Konzentration des Bikarbonates, zumindest während der ersten 20 min., der nach Sekretin entspricht.

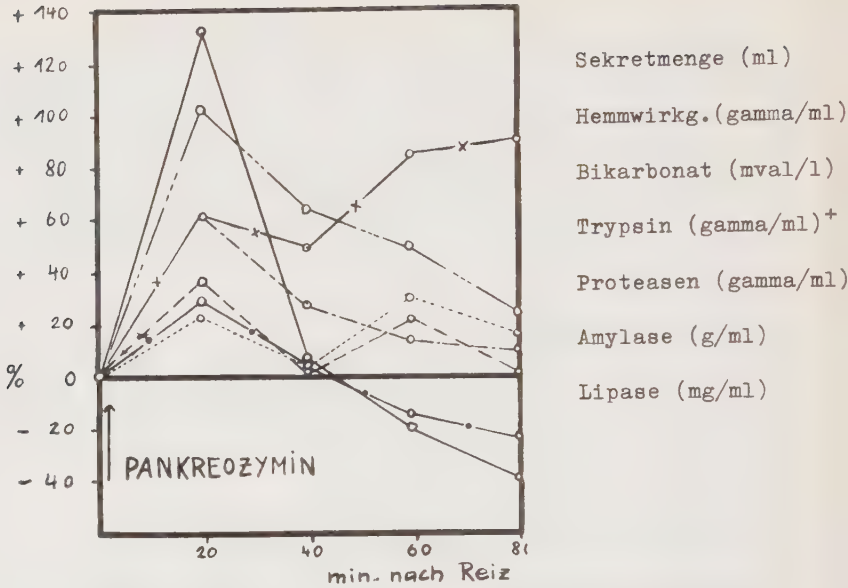


Abb.9 Prozentuales Verhalten von Sekretmenge, Enzym- und Bikarbonatkonzentrationen sowie der Hemmwirkung nach Pankreozyminreiz, bezogen auf den 100 min.-Wert (=Zwischenwert) des vorausgegangenen Sekretinreizes. Mittelwerte aus 8 Pankreozymin-testen. Vergleiche auch Tabelle 13.

	Zwischenwert	20	40	60	80	min. nach Reiz
Sekretmenge (ml)	15	35	16	12	9	
Bikarbonat (mval/l)	66	101	82	75	63	
Hemmwirkg. (gamma/ml) ⁺	1400	1800	1420	1170	1060	
Trypsin (gamma/ml) ⁺⁺	103	141	106	126	105	
Proteasen (gamma/ml)	490	792	626	554	534	
Amylase (g/ml)	4,5	5,4	4,6	5,7	5,1	
Lipase (mg/ml)	320	510	477	594	606	
p _H -Wert		7,1	7,3	7,2	7,2	

Tab.13 Mittelwerte aller Bestimmungen aus 8 Pankreozymin-testen nach vorausgegangenen Sekretintest mit einfachem Reiz.

⁺ s. Methodik

⁺⁺ vergleiche Fußnote Seite 13

Verhalten der Gesamtausscheidung:

Es wurde nun, analog zur Auswertung des Sekretintestes, die durch Berücksichtigung der Saftmenge errechnete Gesamtmenge der einzelnen Enzyme, bezogen auf den 100 min.-Zwischenwert nach vorausgegangenem Sekretinreiz, dargestellt. Nach Pankreozyminreiz findet sich (Abb.10) zunächst ebenfalls eine Erhöhung aller Enzymmengen. Bemerkenswert erscheint jedoch, daß bereits nach 40 min. - mit Ausnahme der Lipase - der Spiegel der Basalsekretion fast wieder erreicht und im Folgenden sogar unterschritten wird. Auffallend ist auch hier die weitgehende Parallelität der einzelnen Enzyme. Lipase wird zwar selektiv leicht vermehrt, jedoch gleichsinnig sezerniert.

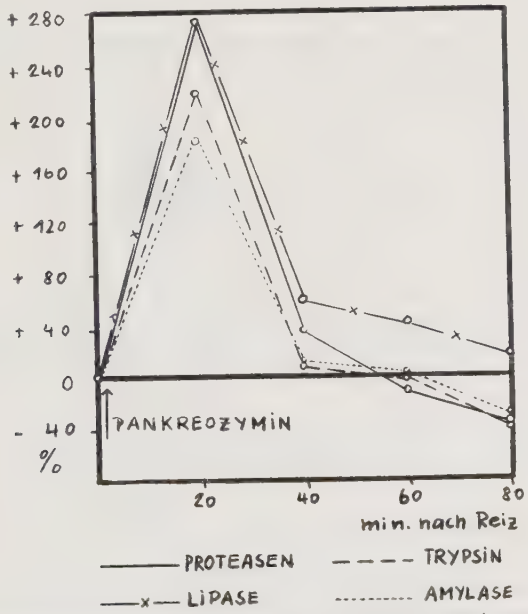


Abb.10 Enzymgesamtausscheidung nach Pankreozyminreiz. Mittelwerte aus 8 Testen. Vergleiche auch Tabelle C im Anhang.

Vergleich von Sekretin- und Pankreozyminwirkung:

Wie wir gesehen haben, ist die Höhe der Enzymkonzentrationen vor allem von der Saftmenge abhängig. Es soll daher im Folgenden die Frage geklärt werden, ob die nach Pankreozymin resultierenden höheren Konzentrationen durch die geringere Saftmenge bedingt sind oder ob tatsächlich mehr Enzyme im Vergleich zum Sekretin ausgeschieden werden.

Es wurden nur die Gesamtausscheidungen der ersten 20 min. Fraktionen nach Sekretin- und Pankreozyminreiz verglichen, da der Pankreozyminreiz nach dieser Zeit bereits wieder abklingt. Alle Sekretinwerte wurden als 100 % eingesetzt und das prozentuale Verhalten der Pankreozyminwerte darauf bezogen. Bei gleicher Reizwirkung müßten die Enzymmengen denen nach Sekretin entsprechen, da die geringere Saftmenge dann durch die höheren Konzentrationen ausgeglichen würde.

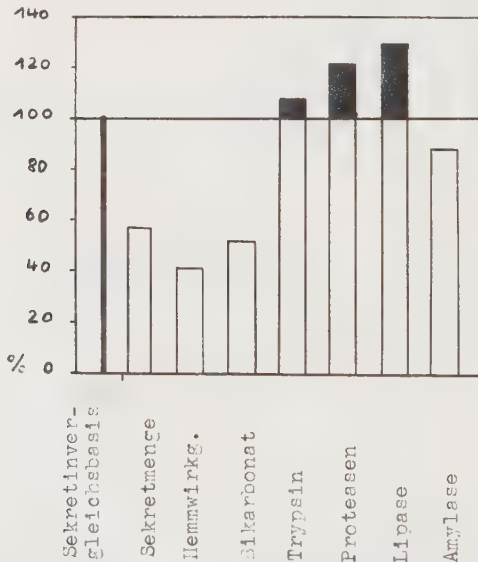


Abb.11 20 min.-Leistung nach Pankreozyminreiz, verglichen mit der 20 min.-Leistung nach Sekretinreiz.

Wie aus Abb.11 ersichtlich, werden nach Pankreozymin beim Vergleich zum Sekretin vermehrt Lipase, Trypsin und Proteasen ausgeschieden, Amylase weniger und Bikarbonat auffallend weniger. Auch die Hemmwirkung ist geringer. Daraus ist ersichtlich, daß nach Pankreozyminreiz bei Vergleich der optimalen Reizwirkungen die hydrokinetische Funktion weitaus weniger, die ekbolische dagegen stärker als nach Sekretinreiz stimuliert wird.

Aus Tab.14 sind die Zahlenwerte der Gesamtleistung der Drüse während 80 min. Sekretionsdauer nach Sekretin- und Pankreozyminreiz und das prozentuale Verhalten der Pankreozyminwerte im Vergleich zu den Sekretinwerten zu ersehen.

	Sekretin	Pankreozymin	Prozentuales Verhalten
Sekretmenge (ml)	178,00	72,00	- 60 %
Bikarbonat (mval)	18,14	6,31	- 65 %
Trypsin (mg)	14,00	9,09	- 35 %
Proteasen (mg)	68,44	49,10	- 28 %
Amylase (g)	593,00	377,00	- 36 %
Lipase (g)	39,16	38,05	- 3 %

Tab.14 Vergleich der Gesamtsekretion⁺ innerhalb 80 min. nach Sekretin und Pankreozymin und der prozentuale Abfall der Gesamtmengen nach Pankreozymin.

Nach dieser Zeit wird nach Pankreozymin trotz der wesentlich kürzeren Reizwirkung Lipase noch in fast gleicher Menge ausgeschieden wie nach Sekretin.

Weiter war es von Interesse, die Wirkung der beiden Sekretionshormone mit der Basalsekretion während 20 und 80 min. Sekretionsdauer zu vergleichen. Zu diesem Zweck mußte der 20 min. Basalwert, entsprechend der Testdauer nach Reiz, mit 4 multipliziert werden. Aus Abb.12 ist bei Vergleich der 20 min. Leistungen erkennbar, daß sowohl Sekret wie Enzyme und Bikarbonat nach Sekretin und auch nach Pankreozymin wesentlich höher liegen als bei der Basalsekretion. Die Hemmwirkung ist in den nach Sekretin gewonnenen Säften auffallend höher.

⁺ vergleiche Fußnote Seite 13

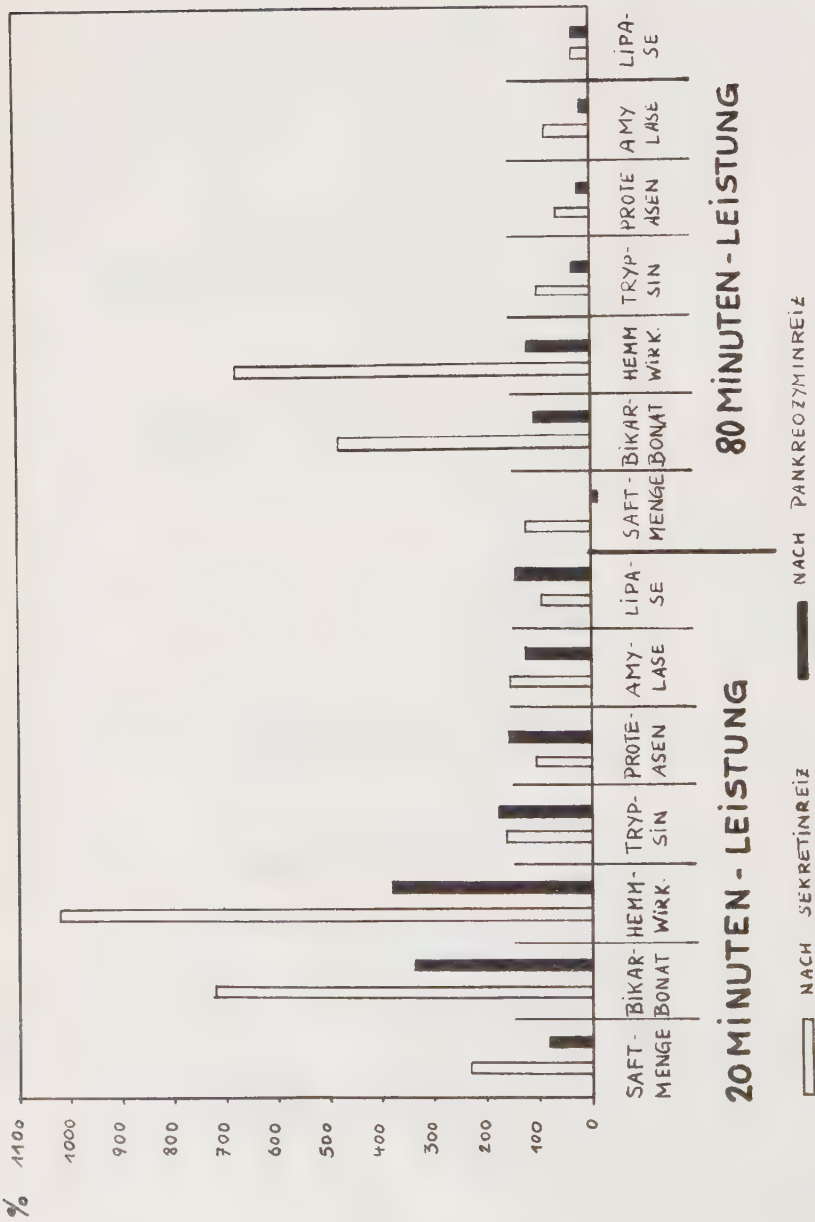


Abb. 12 Prozentualer Vergleich der 20 und 80 min. Leistung des Pankreas nach Sekretin - und Pankreozymreiz, bezogen auf die 20 und 80 min. Basalsekretion. Vergl. auch Tab. 2 im Anhang.

Beim Vergleich der 80 min. Leistungen hingegen, ist nach Pankreozymin eine Steigerung nurmehr der Lipase zu finden, während die anderen Werte nicht mehr signifikant erhöht sind. Nach Sekretin bleibt die starke Erhöhung, wenn auch nicht mehr in dem Ausmaß der ersten 20 min., bestehen.

Klinische Auswertung von Sekretintesten.

Für jede Einzelbestimmung der Teste wurde entsprechend dem Vorgehen von DREILING und JANOWITZ (14) ein Endwert errechnet: Die Enzymkonzentrationen pro ml der 4 Fraktionen nach Sekretin wurden mit der jeweiligen Saftmenge multipliziert, die so erhaltenen Gesamtmengen addiert und die Summe aus allen Fraktionen durch das Körpergewicht des Patienten dividiert. Der Endwert wurde in der jeweiligen Maßeinheit - bezogen auf die abgebaute Substratmenge - pro kg Körpergewicht angegeben. Das Verhalten des Bikarbonates wurde durch die Fraktion mit der höchsten Bikarbonatkonzentration bestimmt. Die Gesamtsaftmenge von 80 min. Sekretionsdauer wurde in ml/kg angegeben.

Unter 59 in dieser Weise ausgewerteten Sekretintesten fanden sich 31, die entweder durchgehend oder mit Ausnahme einer Bestimmung im Normalbereich lagen (Tab.15).

Normalbereich ⁺	
Saftmenge	2,5 - 4,0 ml/kg
Bikarbonat	über 90 mval/l
Trypsin	0,08 - 0,26 mg/kg
Proteasen	0,65 - 1,50 mg/kg
Amylase	5,8 - 12,8 g/kg
Lipase	386 - 854 mg/kg

Tab.15 Labornormalbereich der verschiedenen Bestimmungen des Sekretintestes (statistisch ermittelt aus 59 Normaltesten, Formeln s.Tab.16).

⁺ s. Methodik und Fußnote Seite 13

Darüberhinaus konnten drei Gruppen von Testen mit pathologischen Veränderungen abgegrenzt werden:

1) 7 Teste mit eindeutig stark erniedrigten Werten. Bei den Patienten dieser Gruppe fanden sich folgende Krankheitsbilder:

Anzahl	Diagnose
1	Pankreasfibrose
1	Peritoneal - Tbc.
1	Inselzelladenom
1	posthep. Hyperbilirubinämie
3	chronische Pankreatitis

2) 11 Teste, bei denen zwei und mehr Bestimmungen erniedrigt waren, als "indifferent" erniedrigt bezeichnet,

3) 10 Teste, bei denen zwei und mehr Bestimmungen erhöht waren, als "indifferent" erhöht bezeichnet.

Die Patienten der Gruppe 2 und 3 hatten oft unklare Oberbauchschmerzen, dyspeptische Beschwerden, Verdauungsstörungen und auch Gallenblasen- und -wegsaffektionen.

In Abb.13 ist die Streubreite der normalen und pathologischen Teste für die verschiedenen Bestimmungen dargestellt. Es zeigt sich, daß neben den pathologisch erniedrigten auch die indifferent erniedrigten und erhöhten Teste weitgehend außerhalb des Normalbereiches liegen. Eine Ausnahme bildet dabei die Bestimmung der Amylase, bei der eine große Anzahl ansonsten pathologischer Teste im Normalbereich zu finden ist.

Um einen Gesamtvergleich zwischen den einzelnen Gruppen vornehmen zu können, wurden für die verschiedenen Bestimmungen bei jeder Gruppe die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Aus Tab.16 ist das Verhalten der pathologischen Formen im Vergleich zu den normalen Testen ersichtlich.

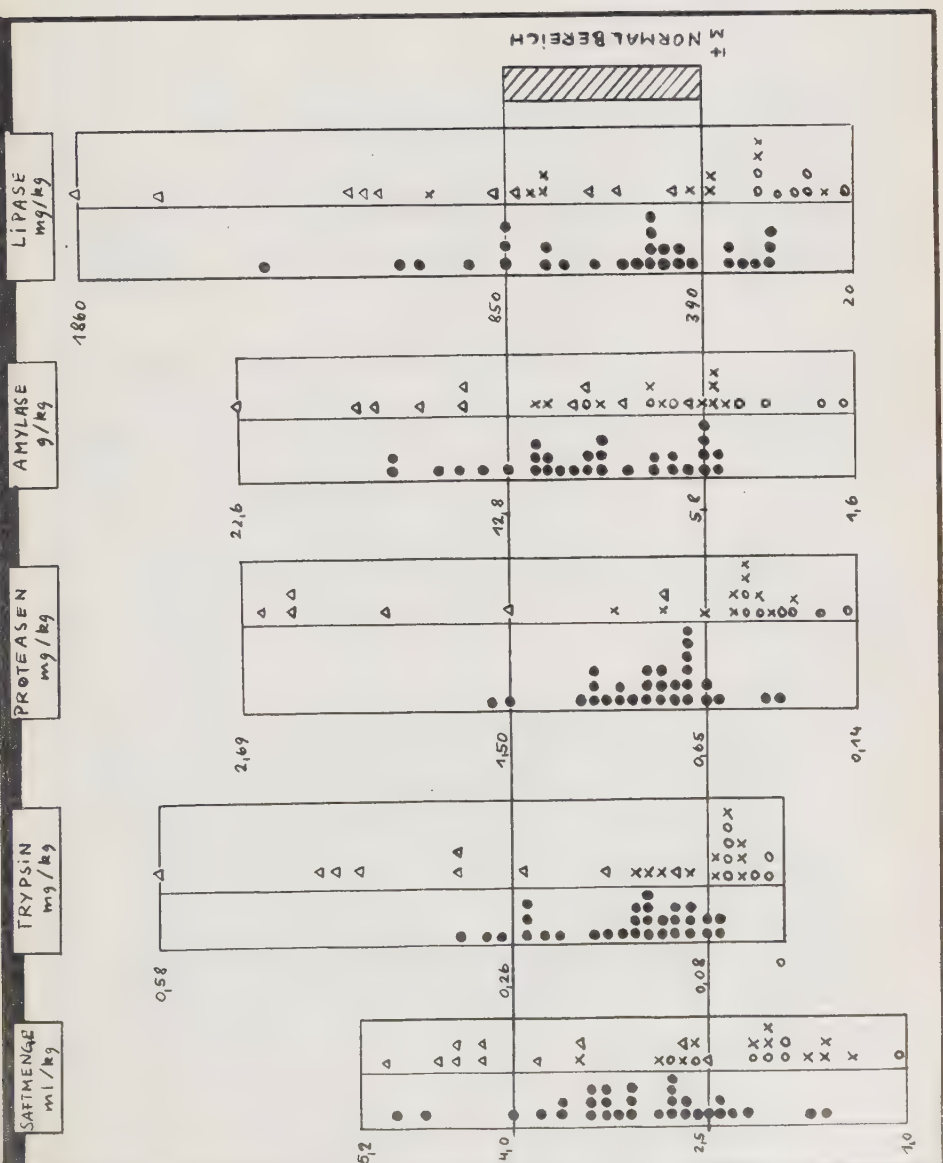
Wie auch Abb.14 zeigt, findet man beim Vergleich der Bereiche bei den proteolytischen Enzymen die eindeutigsten Veränderungen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen treten hier sehr deutlich hervor. Dabei entsprechen die indifferent erniedrigten Teste weitgehend den eindeutig pathologisch erniedrigten. Bei der Lipase und Amylase überschneiden sich die Bereiche der indifferenten Gruppen und reichen weit in den Normalbereich hinein. Beim Bikarbonat wurden Veränderungen nur bei den eindeutig pathologisch erniedrigten Testen gefunden.

ZEICHENERKLÄRUNG:

- normal
- pathologisch erniedrigt
- x indifferent erniedrigt
- △ indifferent erhöht

Abb. 13

Streubreite der normalen und pathologisch veränderten Sekretinteste.



	Anzahl		Mittelwert	Standard- abweichung	Bereich
	Pat.	Teste			
normal					
Speichermenge (ml/kg)	25	31	3,1	+ 0,73	2,4 - 3,8
Bikarbonat (mVal/l)	27	28	104	+ --	---
Trypsin (mg/kg)	25	30	0,15	+ 0,07	0,08 - 0,22
Proteasen (mg/kg)	23	29	0,86	+ 0,20	0,66 - 1,06
Amylase (g/kg)	27	30	9,9	+ 3,4	6,5 - 13,3
Lipase (mg/kg)	24	29	597	+ 182	415 - 779
indifferent erhöht					
Speichermenge (ml/kg)	10	10	3,9	+ 0,8	3,1 - 4,7
Bikarbonat (mVal/l)	8	8	101	+ --	---
Trypsin (mg/kg)	9	9	0,33	+ 0,15	0,18 - 0,48
Proteasen (mg/kg)	6	6	2,00	+ 0,68	1,32 - 2,68
Amylase (g/kg)	10	10	13,9	+ 5,0	8,9 - 18,9
Lipase (mg/kg)	10	10	1044	+ 462	582 - 1506
indifferent erniedrigt					
Speichermenge (ml/kg)	11	11	2,2	+ 0,7	1,5 - 2,9
Bikarbonat (mVal/l)	10	10	100	+ --	---
Trypsin (mg/kg)	10	10	0,08	+ 0,04	0,04 - 0,12
Proteasen (mg/kg)	10	10	0,57	+ 0,23	0,34 - 0,80
Amylase (g/kg)	10	10	7,4	+ 2,6	4,4 - 10,0
Lipase (mg/kg)	10	10	509	+ 294	215 - 803
pathologisch erniedrigt					
Speichermenge (ml/kg)	7	7	2,0	+ 0,6	1,4 - 2,6
Bikarbonat (mVal/l)	7	7	90	+ --	---
Trypsin (mg/kg)	7	7	0,04	+ 0,02	0,02 - 0,06
Proteasen (mg/kg)	7	7	0,30	+ 0,17	0,13 - 0,47
Amylase (g/kg)	7	7	5,0	+ 3,3	1,7 - 8,3
Lipase (mg/kg)	7	7	179	+ 84	95 - 263

Tab.16 Anzahl, Mittelwerte, Standardabweichungen und Bereiche von normalen, indifferent erhöhten, indifferent erniedrigten und durchgehend pathologisch erniedrigten Sekretintesten, errechnet aus folgenden Formeln:

$$\text{Standardabweichung (s)} = \sqrt{s^2}; s^2 = \frac{1}{N-1} \left(\sum (x^2) - \frac{[\sum(x)]^2}{N} \right);$$

s^2 = Streubreite

N = Zahl der Fälle

$\sum(x^2)$ = Summe der Quadrate der Fälle

$[\sum(x)]^2$ = Quadrat der Summe der Fälle

+ vergl. Fußnote Seite 13

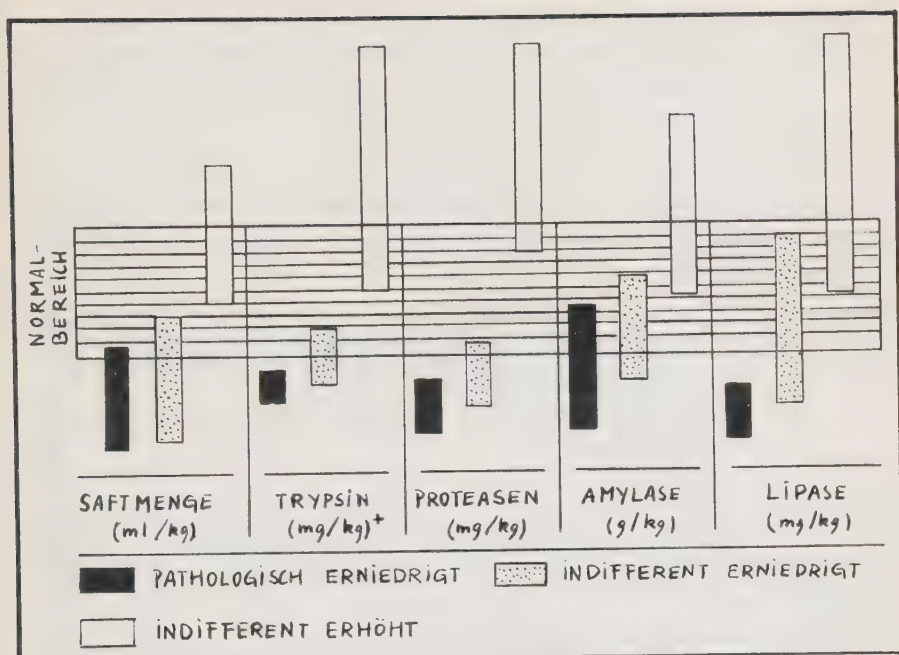


Abb. 14 Vergleich der Standardabweichungen bei pathologisch erniedrigten, indifferently erniedrigten und indifferently erhöhten Sekretintesten mit der Standardabweichung der Normalteste.

Der Einfluß von Kalzium auf die proteolytische Aktivität des Duodenalsaftes.

Die stabilisierende Wirkung von Kalziumionen gegenüber Trypsin ist seit langem bekannt und von SCHÖN et al. (43) neuerdings wieder beschrieben worden. Es erschien deshalb von Interesse, die Wirkung des Kalziums auf die tryptische Aktivität des Duodenalsaftes zu untersuchen. Weiter sollte geklärt werden, ob

⁺ vergleiche Seite 33

schon physiologische Schwankungen der Kalziumkonzentrationen der Säfte ein verschiedenartiges Verhalten erkennen lassen.

I. Einfluß auf die Aktivität der Enzyme.

Im intraduodenal gewonnenen Pankreassekret liegen die Enzyme, wie wir gesehen haben, in aktiver Form vor. Durch Zusatz von CaCl_2 -Lösung wurde geprüft, ob dadurch noch eine weitere Aktivierbarkeit möglich war.

- Vorgehen: 1) 0,5 ml Saft wurden mit 0,3 ml 0,25 m CaCl_2 versetzt und 10 min. bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Trypsin nach der Methode von BRATTON-MARSHALL bestimmt.
- 2) Zur Bestimmung der Gesamtproteasen nach ANSON wurde ein Ansatz von 0,1 ml Saft mit 0,1 ml 0,25 m CaCl_2 versetzt.

	Anzahl der Säfte	gamma/ml Spon- tanaktivität ⁺	gamma/ml Aktivit. nach Ca-Zusatz	Steige- rung
Trypsin	15	34	50	47 %
Proteasen	17	247	323	30 %

Tab.17 Prozentuale Steigerung der Mittelwerte der Trypsin- und Gesamtproteasenaktivität im Duodenalsaft nach Zugabe von CaCl_2 .

Es fand sich (Tab.17) eine signifikante zusätzliche Aktivierbarkeit für Trypsin und Gesamtproteasen.

Um den Einfluß von physiologischen Kalziummengen auf die Aktivität der Enzyme zu prüfen, wurde bei 34 Sekretintesten in jeder Fraktion das Kalzium bestimmt und die Aktivitäten nach Gruppen mit steigender Kalziumkonzentration zusammengestellt. Aus Abb.15 ist das Verhalten der einzelnen Enzyme bei steigender Kalziumkonzentration zu ersehen (Schwankungsbreite von 0,6 - 10,9 mg % Kalzium).

Es fand sich ein starker Anstieg des Trypsins, das bei 8 und mehr mg% Kalzium nahezu 220 % höher lag als bei etwa 1 mg%. Die Proteasen verlaufen ungefähr parallel dazu, erreichen jedoch nicht die Steigerung wie das Trypsin allein. Lipase wird erst ab 5 mg%

⁺ vergleiche Fußnote Seite 13

Kalzium beeinflusst und erreicht maximal etwa 80 % Anstieg. Die geringsten Veränderungen erfährt die Amylase, die erst bei höchsten Kalziumkonzentrationen einen Anstieg erkennen läßt.

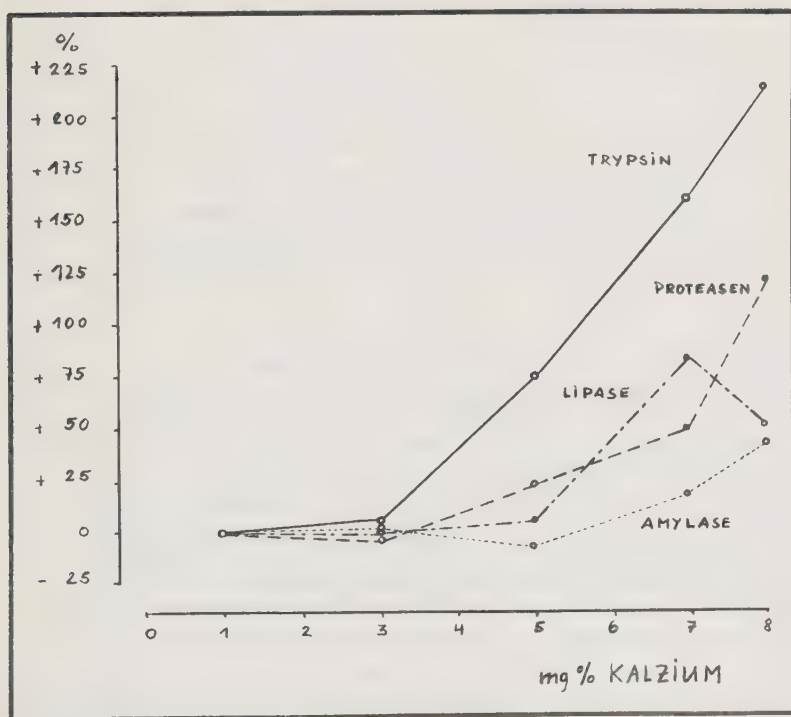


Abb. 15 Abhängigkeit der Enzymaktivitäten vom Kalziumgehalt des Duodenalsaftes. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus den Gruppen 0 - 2,0; 2,1 - 4,0; 4,1 - 6,0; 6,1 - 8,0; 8,1 und mehr mg% Kalzium gebildet. Vergleiche auch Tab.E im Anhang.

Einfluß der Galle auf die Aktivität der Enzyme im Duodenalsaft.

Bei der Durchführung von Sekretintesten fällt häufig bei einzelnen Fraktionen eine oft erhebliche Beimengung von Galle auf, die, unabhängig vom Reiz, offenbar ganz willkürlich auftreten kann.

Um zu überprüfen, ob für das Verhalten der Enzyme eine Abhängigkeit vom Gallegehalt der nach Sekretinreiz gewonnenen Duodenalsäfte besteht, bestimmten wir bei 40 Sekretintesten in den einzelnen Fraktionen das Gesamtbilirubin, das nach VAN DEN BERGH als Maß für die Gallebeimengung angesehen werden kann.

Vorher wurde geklärt, daß Blasengalle in konzentrierter und verdünnter Form keine tryptische oder proteolytische Aktivität bei den Methoden nach BRATTON - MARSHALL und ANSON aufweist.

Einfluß der physiologischen Bilirubinkonzentration:

Die in den Duodenalsäften gemessenen Bilirubinwerte wurden in Gruppen zusammengefaßt, jeder Gruppe die entsprechenden Enzymwerte zugeordnet und daraus der mittlere Enzymwert errechnet (vergl. Tab. F im Anhang). Wie aus Abb. 16 zu ersehen, ergibt sich für alle bestimmten Enzyme eine Abhängigkeit vom Gallegehalt, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß.

Die tryptische Aktivität, welche die auffälligste Veränderung zeigt, beträgt im Mittel in der untersten Gruppe (= 0 - 0,4 mg% Bilirubin) 24 gamma/ml und steigert sich auf 125 gamma/ml in der obersten Gruppe (= 11,5 und mehr mg% Bilirubin). Das entspricht einem Anstieg von 420 %. Die Lipase erreicht eine Steigerung von etwa 200 %, die Proteasen von etwa 160 %, während die Amylase lediglich um ca. 30 % höher liegt.

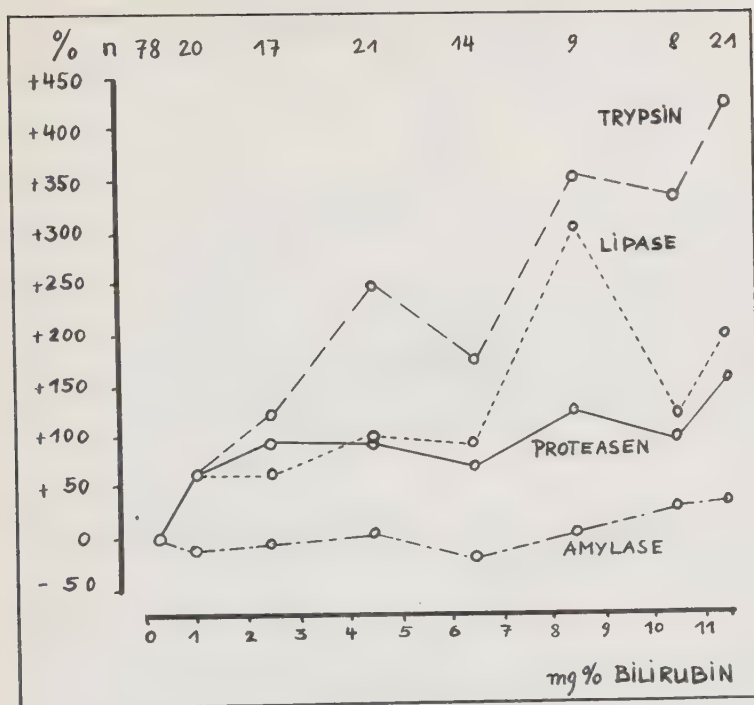


Abb.16 Abhängigkeit der Enzymaktivitäten vom steigenden Bilirubingehalt in Duodenalsäften. Mittelwerte aus 40 Sekretintesten. Vergleiche auch Tabelle F im Anhang.

Gallesekretion nach Sekretin- und Pankreozyminreiz:

Das von uns verwandte Pankreozyminpräparat enthielt Beimengungen von Cholecystokinin, so daß nach Pankreozyminreiz nur gallehaltige Säfte zu gewinnen waren. Wir untersuchten Gallefluß während des Testablaufes nach zweitem Sekretinreiz (7 Tests) und verglichen ihn mit dem nach Pankreozymin (8 Tests). Es stellte sich heraus (Abb.17), daß - wie zu erwarten - der Gallefluß nach Pankreozymin wesentlich stärker war als nach Sekretin.

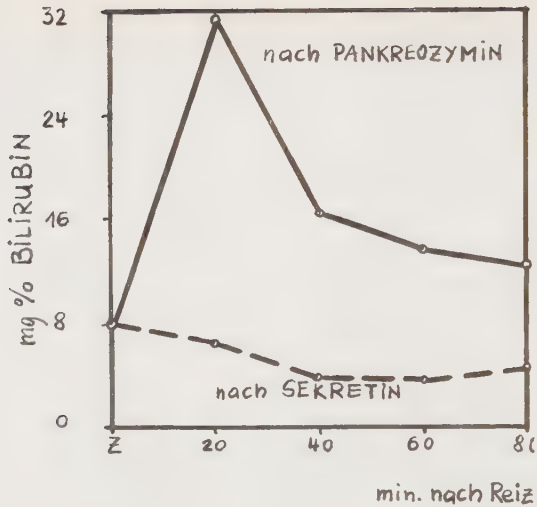


Abb. 17 Bilirubingehalt der einzelnen Fraktionen nach Sekretin- und Pankreozyminreiz. Mittelwerte aus 7 Sekretin- und 8 Pankreozymin-Testen.

Um zu klären, ob die nach Pankreozymin resultierenden höheren Enzymkonzentrationen auch durch die stärkere Gallebeimengung bedingt sind, verglichen wir bei den Gruppen mit der höchsten Bilirubinkonzentration (= 11,5 und mehr mg% Bilirubin) die Mittelwerte nach Sekretin (25 Proben) und nach Pankreozymin (19 Proben), so daß bei beiden Kollektiven annähernd die selbe Bilirubinkonzentration vorlag.

Danach ergibt sich (Tab. 18) für den Pankreozyminreiz eine nur geringfügig höhere mittlere Konzentration als nach Sekretin. Dagegen liegen die insgesamt ausgeschiedenen Mengen bei allen Bestimmungen unter den entsprechenden Sekretinwerten.

	11,5 mg% und mehr Bilirubin bei Sekretintesten		11,5 mg% und mehr Bilirubin bei Pankreozymin-Testen	
	Konzentration ⁺	Gesamtmenge	Konzentration ⁺	Gesamtmenge
Trypsin	125 (gamma/ml)	4,388 mg	141 (gamma/ml)	2,721 mg
Proteasen	558 (gamma/ml)	19,586mg	764 (gamma/ml)	14,745mg
Lipase	552 (mg/ml)	19,045mg	656 (mg/ml)	12,661mg
Amylase	4,4 (g/ml)	154 g	5,6 (g/ml)	108 g
Kalzium	4,8 (mg%)	1,69 mg	8,0 (mg%)	1,54 mg

Tab. 18 Enzym- und Kalziumkonzentrationen sowie Gesamtausscheidung nach Sekretin- und Pankreozyminreiz in Fraktionen mit 11,5 und mehr mg% Bilirubin.

+ vergl. Fußnote Seite 13

Auffälligerweise sind jedoch die Enzymkonzentrationen nach Sekretinreiz in diesem Kollektiv wesentlich höher als wir es normalerweise bei Sekretintesten mit weniger Galle beobachteten und übertreffen sogar die Konzentrationen der Basalsekretion.

In vitro Versuche zur Gallewirkung:

Nachdem sich die Enzymaktivitäten vom Gallegehalt abhängig zeigten, lag es nahe zu prüfen, ob durch Zugabe von unphysiologisch hohen Mengen menschlicher Blasengalle zum Saft in vitro ein weiterer Anstieg der Enzymaktivitäten sich erzielen läßt.

Vorgehen: Bei Mischsäften aus 4 Fraktionen nach Sekretinreiz wurde die tryptische und proteolytische Aktivität bestimmt und analog zur gleichen Ansatzmenge 0,3 ml Blasengalle 1:10 verdünnt, Galle + 0,3 ml (= 1,5 mg) Enterokinase, Galle + 0,3 ml 0,25 m CaCl_2 und Galle + 0,3 ml Enterokinase + 0,3 ml CaCl_2 hinzugegeben. Die 2 Ansätze wurden 10 min. bei 37° C vorinkubiert und anschließend bestimmt.

Es ergab sich (Tab.19), daß durch Zugabe von Galle die tryptische wie die proteolytische Aktivität im Mittel noch um etwa 30 % gesteigert werden konnte. Eine weitere Steigerung war durch Enterokinase- und Kalziumzusatz zu erzielen.

	Ansatz ml	Ausgangs- aktivität (gamma/ml)	Aktivität (gamma/ml) ⁺ nach Zusatz von:			
			Galle	Galle + Enterok.	Galle + Kalzium	Galle+Kalzium + Enterokinase
tryptische Aktivität	0,5	34	43	47	50	50
proteoly- tische Aktivität	0,1	255	337	353	362	372

Tab.19 Verhalten der tryptischen und proteolytischen Aktivität von Duodenalsaft (Mischsäfte aus 4 Fraktionen nach Sekretinreiz) nach Zugabe von Galle, Galle + Enterokinase, Galle + Kalzium und Galle + Kalzium + Enterokinase. Mittelwerte aus 16 Bestimmungen.

Die Amylase blieb durch Galle völlig unbeeinflussbar, das Verhalten der Lipase konnte aus methodischen Gründen nicht untersucht werden.

⁺ vergleiche Fußnote Seite 13

Provokation des Galleflusses durch Hypophysin:

Um in vivo einen Gallefluß zu provozieren, injizierten wir während eines Sekretintestes 20 Patienten 3 E Hypophysin i.m. und verglichen die Enzymgesamtausscheidung im Duodenalsaft vor und nach Hypophysinreiz. Bei 11 der 20 Patienten kam der Gallenblasenreflex nicht zustande.

	Reflex zustandegekommen:			Reflex nicht zustandegek.::		
	vor Reiz	nach Reiz	prozentuales Verhalten	vor Reiz	nach Reiz	prozentuales Verhalten
Saftmenge (ml)	21	19	- 10 %	19	22	+ 16 %
Trypsin (mg) ⁺	1,24	3,08	+ 148 %	0,93	1,11	+ 19 %
Proteasen (mg)	7,3	16,7	+ 129 %	5,5	5,7	+ 4 %
Amylase (g)	72	114	+ 59 %	42	42	+ 0 %
Lipase (g)	5,7	15,9	+ 179 %	3,8	4,4	+ 17 %
Kalzium (mg%)	3,8	5,9	+ 55 %	5,8	6,1	+ 5 %
Bilirubin (mg%)	1,8	34,2	+1800 %	4,7	5,4	+ 14 %

Tab.20 Vergleich des Verhaltens von Enzymen, Sekretmenge, Bilirubin und Kalzium

- vor und nach Hypophysingabe bei zustandegekommenem Gallenblasenreflex (Mittelwerte aus 9 Fällen)
- vor und nach Hypophysingabe bei nicht zustandegekommenem Gallenblasenreflex (Mittelwerte aus 11 Fällen).

Wie aus Tab.20 ersichtlich, kann durch die Gruppe mit nicht zustandegekommenem Gallenblasenreflex eine Steigerung der Enzymsekretion durch das Hypophysin selbst ausgeschlossen werden. Bei eingetretenem Reflex fällt zunächst die erhebliche Steigerung der Bilirubinkonzentration auf. Weiterhin sind nach Reflex sämtliche Enzyme signifikant erhöht, am stärksten Lipase (180 %) und am wenigsten Amylase (60 %). Ferner ist ein Anstieg der Kalziumkonzentration zu verzeichnen, während die Sekretmenge praktisch unverändert bleibt.

⁺ s. Methodik

D i s k u s s i o n
= = = = =

I. Trypsinhemmende Wirkung im Duodenalsaft.

Im reinen Pankreassekret, das durch Drainage des Ductus Wirsungianus gewonnen wird, kann ein für Trypsin spezifischer Inhibitor nachgewiesen werden (24). Zur Klärung der Frage, welches Schicksal dieser Inhibitor erfährt, nachdem das Sekret in das Duodenum gelangt ist, untersuchten wir Duodenalsäfte auf ihre Hemmwirkung gegenüber kristallinem Trypsin.

Bei verschiedenen Inkubationszeiten und -temperaturen wie auch variierten Ansatzmengen und Verdünnungen fand sich eine starke Hemmwirkung der Duodenalsäfte, die von uns zunächst auf die Wirkung eines Inhibitors bezogen wurde. Auch Ausschaltung der Enzymaktivitäten durch Kochen änderte an diesem Verhalten nichts. Zu weiteren Untersuchungen des Hemmeffektes zogen wir auf Vorschlag Herrn Professor Werles eine Methode (mit BAPA als Substrat) heran, mit der auch ohne Inkubation des Ansatzes unmittelbar die Hemmung des reinen Trypsins durch Duodenalsaft erfaßt werden konnte. Hier zeigte sich bei zunehmender Inkubationszeit eine steigende Hemmwirkung bei 37° C, auch wenn der Selbstabbau des Trypsins berücksichtigt wurde, keine Hemmwirkung bei 25° C.

Da von einem echten Inhibitor gefordert werden muß, daß er auch bei niedriger Temperatur und schon nach sehr kurzer Inkubationszeit annähernd das Maximum seiner Reaktion erreicht haben muß, sprechen unsere Befunde dafür, daß die Hemmwirkung im Duodenalsaft nicht auf einem Inhibitor beruht. Ein Ioneneffekt konnte durch Bestimmung des Glührückstandes ebenfalls ausgeschlossen werden. Wir müssen daher annehmen, daß es sich um einen enzymatischen Abbau des kristallinen Trypsins handelt, der bei längerer Einwirkungszeit des Duodenalsaftes zu einer zunehmenden Schädigung des Trypsins führt. Hierfür kommen besonders Pepsin und Kathepsin in Frage, die einerseits mit dem Magensaft in das Duodenum gelangen, andererseits auch mit dem Duodenalsekret ausgeschieden werden.

Der in der Drüse vorliegende und mit dem Pankreassekret ausgeschiedene Trypsininhibitor hat möglicherweise eine wesentliche Schutzfunktion gegenüber einer vorzeitigen Aktivierung des Trypsinogens, wie sie als Pathogenese der akuten Pankreatitis und Pankreasnekrose immer wieder diskutiert wird (7,8,12,18). Im Duodenum könnte er bei der durch Enterokinase erfolgenden Aktivierung des Trypsinogens an aktives Trypsin gekoppelt und damit unwirksam werden. Dies ist umso wahrscheinlicher, als das Gleichgewicht - dissoziierter Inhibitor / Trypsininhibitor-Komplex - im alkalischen Milieu ganz auf Seiten des Komplexes liegt. Zur Verdauung dürfte dennoch genügend aktives Trypsin bereitstehen, da mit dem Pankreassekret wesentlich mehr Trypsinogen als Inhibitor ausgeschieden wird (24).

II. Sekretorischer Reiz des Pankreas und Bedeutung für die klinische Diagnose.

Auf Sekretin- und Pankreozyminreiz reagiert die Drüse in charakteristischer Weise: Während nach Sekretin ein starker Sekretfluß mit hoher Bikarbonatabgabe einsetzt, stimuliert Pankreozymin vorwiegend die Enzymsekretion. Dabei fällt auf, daß der Pankreozyminreiz nur 20 min., der Sekretinreiz dagegen 60 - 80 Minuten wirksam ist. Nach Pankreozymin liegen die Enzymkonzentrationen zwar hoch über dem Basalniveau, reichen aber auf Grund der geringeren Sekretmenge nicht aus, um die gleiche Enzymgesamtausscheidung wie nach Sekretin zu erzielen. Es darf aber angenommen werden, daß der geringe Saftfluß nicht ausreicht, die von der Drüse produzierten Enzyme auszuschwemmen.

Für klinisch diagnostische Zwecke erscheint uns aus diesem Grunde der Sekretintest geeigneter als der Pankreozymin-test, zumal auch durch die hohe Bikarbonatausscheidung leichter alkalische Duodenalsäfte erhalten werden, was für Enzymbestimmungen von wesentlicher Bedeutung ist. Schlüsselt man Sekretinteste auf, die vom Normalbereich abweichen und berücksichtigt dabei klinische Gesichtspunkte, so kann man charakteristische Testgruppen abgrenzen, die bestimmten Krankheitsbildern zuzuordnen sind. Durchgehend stark eingeschränkt ist die Funktion der

Drüse bei schweren Krankheiten wie Pankreasfibrose, Inselzelladenom und manifestierter chronischer Pankreatitis. Sind dagegen Anhaltspunkte für eine beginnende Funktionsstörung gegeben, differieren die Teste auch beim selben Patienten außerordentlich stark. Sie können bei einzelnen Bestimmungen unter oder über dem Normalbereich liegen. Oft findet man dieses Verhalten sogar innerhalb eines einzelnen Testes. Bei Spasmen oder stenotischen Veränderungen der abführenden Gänge kann ein niedriger Test durch mangelhaften Abfluß bei im Grunde normaler Pankreasfunktion vorgetäuscht werden.

Schon die Sekretmenge zeigt häufig Veränderungen im Sinne einer Erhöhung oder Verminderung, aus denen sich bereits erste diagnostische Hinweise ergeben. DREILING und JANOWITZ (14) messen auch der Bikarbonatbestimmung wesentliche Bedeutung für die klinische Diagnose bei, während nach unseren Untersuchungen hier die geringsten Abweichungen zu finden sind. Bei den Enzymen fanden wir am ehesten Veränderungen des Trypsins und der Gesamtproteasen, deren Bestimmung wir deshalb für besonders wichtig halten. Dagegen fand sich bei der Amylasebestimmung eine große Anzahl sonst pathologischer Teste im Normalbereich. Dies weist entweder auf ein anderes Verhalten der Amylase hin oder ist methodisch bedingt.

III. Bedeutung des Galleflusses.

Die Beobachtung, daß bei steigendem Gallegehalt die Aktivität der Enzyme in den Duodenalsäften erheblich höher war als in gallefreien Säften und gleichzeitig ein proportionaler Anstieg der Kalziumkonzentrationen resultierte, ließ uns zunächst annehmen, daß diese Aktivitätssteigerungen auf den hohen Kalziumgehalt der Galle zurückzuführen seien. Dafür sprach auch die Beobachtung HAVERBACKs (24), daß die autokatalytische Aktivierung des Trypsinogens durch Kalziumionen beschleunigt und gesteigert werden kann. Bei der Lipase war an die in der Einführung erwähnte komplexe Adsorption des Enzymes an sein Substrat zu denken. Die von uns daraufhin durchgeführten in vitro Untersuchungen ergaben in den Duodenalsäften nach Kalziumzugabe nur eine geringfügige,

nicht signifikante Steigerung der einzelnen Enzymaktivitäten, die sich in ihrer Höhe deutlich von der in vivo beobachteten Abhängigkeit vom Kalziumgehalt unterschieden.

Um weiter zu klären, ob durch Galle hervorgerufene Veränderungen des p_H -Optimums bzw. der Oberflächenspannung an den zu verdauenden Molekülen u.a. für die Aktivitätssteigerungen kausal verantwortlich zu machen seien, setzten wir in analoger Weise gallefreien Duodenalsäften in vitro verschiedene Mengen Galle zu. Auch hierbei waren nur gelegentliche, nicht signifikante Aktivitätssteigerungen zu finden.

Es mußte daher gefolgert werden, daß die Galle nicht eine unmittelbare Wirkung auf die Aktivität der Enzyme ausübt, sondern daß ihr Angriffspunkt vielmehr im Duodenum selbst liegt. Durch einen willkürlich provozierten Gallefluß mußte demnach jederzeit eine höhere Enzymsekretion reproduzierbar sein. Bei Verwendung von Hypophysin, das keine Wirkung auf die Pankreassekretion selbst ausübt, fanden wir nach positivem Gallenblasenreflex erwartungsgemäß einen starken Anstieg der ausgeschiedenen Enzymmengen mit Ausnahme der Amylase. Da es als unwahrscheinlich anzusehen ist, daß aus der Duodenalschleimhaut freigesetzte Aktivatoren einen derartig hohen Enzymanstieg bewirken können, dürfte eine unmittelbare Anregung der Pankreassekretion durch Galle stattgefunden haben.

ZUSAMMENFASSUNG

=====

1. Die im Duodenalsaft zu beobachtende Hemmwirkung gegenüber kristallinem Trypsin beruht nicht auf einem echten Inhibitor, sondern vermutlich auf einem enzymatischen Abbau des Trypsins. Ein freier Trypsininhibitor war nicht nachweisbar.
2. Die Enzymaktivitäten in Nüchternsekreten vor Sekretintesten zeigen eine Abhängigkeit vom Aciditätsgrad des Duodenalsaftes. Es wurden zur Ermittlung der Basalsekretion nur Säfte mit einem Mindest- p_H von 6,0 herangezogen.
3. Nach Sekretinreiz kommt es zu einem Abfall der Enzymkonzentrationen, dagegen zu einem Anstieg der Sekretmenge und der Bikarbonatkonzentration. Die Enzymgesamtausscheidung ist erhöht. Ein anschließend an den ersten vorgenommenen zweiten Reiz läßt ein völlig gleichartiges Verhalten erkennen.
4. Die vermehrte Saftausschüttung nach Sekretin führt zu einer Verdünnung der Enzymkonzentrationen. Berücksichtigt man dieses, so zeigt es sich, daß die gemessenen Konzentrationen der Enzyme höher liegen als entsprechend der Verdünnung zu erwarten wäre.
5. Nach Pankreozyminreiz steigen die Konzentrationen der Enzyme über das Niveau der Basalsekretion an. Bei der Gesamtausscheidung ergibt sich nur ein geringer Anstieg beim Bikarbonat, für die Enzyme ein höherer. Die Reizwirkung des Pankreozymins ist bereits nach 40 Minuten abgeklungen, während sie nach Sekretin 80 Minuten anhält.
6. Beim Vergleich der 20 und 80 Minuten Leistung des Pankreas nach Sekretin- und Pankreozyminreiz, bezogen auf die Basalsekretion, findet sich beim Pankreozymin nach 20 Minuten eine durchschnittlich höhere Enzymausscheidung als nach Sekretin. Bikarbonat dagegen wird in wesentlich geringer Menge sezerniert. Nach 80 Minuten findet man signifikante Erhöhungen der Sekretion nurmehr nach Sekretinreiz.

7. Unter 59 Sekretintesten fanden sich 31 normale und drei Gruppen mit pathologischen Veränderungen: 7 Teste, die eindeutig pathologisch erniedrigt waren, 11 indifferent erniedrigte und 10 indifferent erhöhte Teste. Beim Vergleich der Standardabweichungen und Streuungen fanden sich am ehesten und eindeutigsten Veränderungen bei den Bestimmungen des Trypsins und der Gesamtproteasen.
8. Durch Zugabe von Kalzium zum Duodenalsaft konnte die proteolytische Aktivität um etwa 30 % gesteigert werden. Bei steigendem physiologischem Kalziumgehalt des Duodenalsaftes finden sich erheblich höhere Enzymaktivitäten.
9. Bei steigendem Bilirubingehalt findet sich in Duodenalsäften neben einem Anstieg der Kalziumkonzentration auch ein deutlicher Anstieg der Enzymmengen. Durch Hypophysinreiz hervorgerufener Gallefluß in vivo wirkt gleichsinnig. Hypophysin selbst stimuliert das Pankreas nicht.

TABELLARISCHER ANHANG

Tab. A

Zahlenangaben zu Abb. 4:
Abhängigkeit der Enzym-
aktivitäten vom pH-Wert
des Duodenalsaftes.

pH-Wert	0 - 3,0				3,1 - 6,0				6,1 - 7,5			
Trypsin (gamma/ml) +	23				50				103			
Proteasen (gamma/ml)	155				225				538			
Amylase (g/ml)	0,3				2,0				4,1			
Lipase (mg/ml)	131				237				405			

min.nach Sekretinreiz	Basal	20			40			60			80			Zwischen- wert	20	40	60	80
Trypsin (gamma) ⁺	1790	3460			3070			3300			1880			1050	4600	3800	3400	2110
Proteasen (mg)	10,6	23,2			17,5			17,3			11,5			11,3	22,0	10,5	15,4	10,7
Amylase (g)	84	237			151			151			90			90	214	176	110	24
Lipase (g)	7,4	10,0			14,0			0,5			5,5			4,2	13,7	11,3	9,1	6,0

Tab. B Zahlenwerte zu Abb. 7: Enzymgesamtausscheidung nach einfachem (36 Fälle) und wiederholtem (21 Fälle) Sekretinreiz.

+ Erklärung der Maßangaben s. Methodik.

min.nach Pankreozyminreiz	Zwischen- wert	20	40	60	80
Trypsin (gamma) ⁺	1550	4940	1700	1510	950
Proteasen (mg)	7,4	27,7	10,0	6,6	4,2
Amylase (g)	66	189	74	68	46
Lipase (g)	4,8	17,9	7,6	7,1	5,5

Tab.C Zahlenangaben zu Abb.10: Mittelwerte der Enzym - gesamtausscheidung bei 8 Pankreozymin-Testen, durchgeführt nach vorausgegangenem Sekretintest mit einmaligem Reiz.

	Basal	Sekretin	Pankreozymin
Sekretmenge (ml/80 min.)	76	178	72
Bikarbonat (mVal/80 min.)	3,2	18,1	6,3
⁺ Hemmwirkg. (mg/80 min.)	52	408	109
Trypsin (mg/80 min.)	7,2	14,0	9,1
Proteasen (mg/80 min.)	42,4	68,4	49,1
Amylase (g/80 min.)	336	593	377
Lipase (g/80 min.)	29,6	39,2	38,1

Tab.D Zahlenangaben zu Abb.12: Gesamtleistung des Pankreas während 80 Minuten basaler Sekretion (errechnet) und nach Sekretin - und Pankreozyminreiz.

+ siehe Methodik

mg% Kalzium	0 - 2,0	2,1 - 4,0	4,1 - 6,0	6,1 - 8,0	8,1 und mehr
Trypsin (gamma/ml) ⁺	39	43	70	105	127
Proteasen (gamma/ml)	300	290	370	450	670
Amylase (g/ml)	3,3	3,4	3,1	3,8	4,7
Lipase (mg/ml)	230	230	250	440	360

Tab.E Zahlenangaben zu Abb.15: Abhängigkeit der Enzymaktivitäten vom Kalziumgehalt des Duodenalsaftes (Mittelwerte).

mg% Bilirubin	0 - 0,4	0,5 - 1,4	1,5 - 3,4	3,5 - 5,4	5,5 - 7,4	7,5 - 9,4	9,5 - 11,5	11,6 und mehr
Trypsin (gamma/ml) ⁺	24	39	55	84	65	109	104	125
Proteasen (gamma/ml)	217	353	406	409	360	490	427	558
Lipase (mg/ml)	189	314	304	374	366	764	418	552
Amylase (g/ml)	3,4	3,0	3,1	3,5	2,6	3,4	4,2	4,4

Tab.F Zahlenangaben zu Abb.16: Mittelwerte der Enzymkonzentrationen bei Gruppen mit steigender Bilirubinkonzentration (Mittelwerte aus 40 Sekretintesten).

+ Erklärungen der Maßangaben siehe Methodik.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AGREN, G. und H. LAGERLOF: Acta med. Scand. (Stockholm) 40, 1 (1936)
2. ANSON, M. L.: J. gen. Physiol. 22, 79 (1939)
3. ANSON, M. L. and A. E. MIRSKY: J. gen. Physiol. 17, 151 (1933)
4. ASANG, E.: Langenbecks Arch. u. Dtsch. Z. Chir. 293, 645 (1960)
294, 83 (1960)
294, 305 (1960)
5. BABKIN, B. P.: Secretory Mechanism of the Digestive Glands,
2. Aufl. New York 1959
6. BAYLISS, W. M. and E. H. STARLING: J. Physiol. 28, 325 (1902)
7. BECKER, V.: Der Internist 2, 366 (1961)
8. BECKER, V. und W. WILDE: Klin. Wschr. 41, 73 (1963)
9. BRATTON, A. C. and E. K. MARSHALL jr.: J. Biol. Chem. 128, 537 (1939)
10. CHIRAY, M., J. MERCIER et A. R. SALMON: Bull. Soc. med. Hop. (Paris)
50, 1417 (1926)
11. COPE, O., P. J. CULVER, C. G. MIXTER jr. and G. L. NARDI: Ann. J. Med.
29, 424 (1960)
12. DOERR, W.: Langenbecks Arch. klin. Chir. 292, 552 (1959)
13. DREILING, D. A.: J. Mt. Sinai Hosp. 21, 363 (1955)
14. DREILING, D. A. and H. D. JANOWITZ: Ciba Foundation Symposium: The
Exocrine Pancreas, London 1961
15. FORELL, M. M.: Med. Klin. 57, 864 (1962)
16. FORELL, M. M.: Langenbecks Arch. klin. Chir. 292, 610 (1959)
17. FORELL, M. M.: Dtsch. med. Wschr. 87, 1056 (1962)
18. FORELL, M. M. und W. DOBOVICNIK: Klin. Wschr. 39, 47 (1961)
19. FREUDENBERG, E.: Z. Kinderheilkunde 46, 164 (1928)
20. FREY, E. K., H. KRAUT und E. WERLE: Kallikrein, Stuttgart 1950
21. FREY, E. K.: Therapiewoche 4, 323 (1953/54)
22. GRASSMANN, W., H. KRAUT und H. MÜLLER: in O. HAMMARSTEN, Lehrbuch
der phys. Chemie, Berlin
1951

23. HARPER, A.A. and H.S. RAPER: J. of Physiol. 102, 115 (1943)
24. HAVERBACK, B.J., B. DYCE, H. BUNDY and H.A. EDMONDSON: Ann. J. Med.
29, 424 (1960)
25. HELLER, O.: Jb. Kinderheilkunde 98, 129 (1922)
26. JENDRASSIK, L. und R.A. CLEGHORN: Biochem. Z. 289, 1 (1936)
27. JORPES, E. and V. MUTT: Biochem. J. 52, 328 (1952)
28. KALSER, M.H. and M.J. GROSSMAN: Gastroenterology 29, 35 (1955)
29. KRAUSS, H.: Hippokrates, Zschr. f. prakt. Heilk. 37, 377 (1961)
30. KRAUT, H. und R. KÖRBEL-ENKHARDT: Hoppe Seylers Zschr. phys. Chem.
309, 243 (1957)
31. KRAUT, H. und R. KÖRBEL-ENKHARDT: Hoppe Seylers Zschr. phys. Chem.
312, 161 (1958)
32. KRAUT, H., W. KÖRBEL, W. SCHOLTAN und F. SCHULTZ: Hoppe Seylers Zschr.
phys. Chem. 321, 90
(1960)
33. KUNITZ, M. and J.H. NORTHROP: J. gen. Physiol. 19, 991 (1936)
34. LAGERLÖF, H.: Pancreatic Function and Pancreatic Disease studied
by Means of Secretion, Stockholm and New York 1942
35. LANGENBECK, W., M. AUGUSTIN und C. SCHÄFER: Hoppe Seylers Zschr.
phys. Chem. 324, 54 (1961)
36. LEHNHARTZ, E.: Einführung in die chemische Physiologie, 11. Aufl.
Heidelberg 1956
37. NACHLASS, M.M. and A.M. SELIGMAN: J. Biol. Chem. 181, 343 (1939)
38. NORTHROP, J.H., M. KUNITZ and R.M. HERRIOTT: Crystalline Enzymes,
New York 1948
39. OTTENJANN, R.: Med. Klin. 58, 1999 (1963)
40. RICHTERICH, R.: Enzymopathologie, Heidelberg 1958
41. RICK, W.: in H.U. BERGMAYER, Methoden der enzymatischen Analyse,
Weinheim 1962
42. RIEDEL, A. und E. WUNSCH: Hoppe Seylers Zschr. phys. Chem. 316, 61 (1959)
43. SCHÖN, H. und B. RÄSSLER: Naturwissenschaften 48, 52 (1961)
44. SCHÖN, H., B. RÄSSLER u. J. ALTER: Clin. Chim. Acta 7, 57 (1962)
45. SCHÖN, H., B. RÄSSLER u. N. HENNING: Klin. Wschr. 39, 217 (1961)
46. SCRIBNER, B.H. a. J.C. CAILLOUETTE: J. Am. Med. Ass. 155, 644 (1954)
47. WERLE, E., K. TAUBER, W. HARTENBACH und M.M. FORELL: Münch. Med. Wschr.
100, 1265 (1958)
48. WERLE, E., L. MAIER u. R. RINGELMANN: Naturwissensch. 29, 328 (1952)
49. ROMAN, W., and S. FAVILLA: Enzymologia XXVI, 17 (1963)

Herrn Prof. Dr. M.M. F o r e l l möchte ich für die Überlassung des Themas und für die Anregungen während der Durchführung der Untersuchungen meinen besonderen Dank sagen.

Herrn Priv. Doz. Dr. Hess und Herrn Dr. Baumgartner in Zürich sei für die freundliche Unterstützung bei der Gewinnung von reinem Pankreassekret gedankt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E.Werle, Vorstand des klinisch - chemischen Institutes der Chirurgischen Universitätsklinik München, und Herrn Dr. J.Fritz danke ich für die anregenden Diskussionen zur methodischen Durchführung der Hemmbestimmungen.

Frl. I.Frost, Frl. H.Grohrock und Frau M.Kindlinger möchte ich für ihre wesentliche Mithilfe bei der technischen Durchführung der Untersuchungen danken.

LEBENS LAUF

Am 28. Juli 1937 wurde ich, Horst-Peter Stahlheber, als ältestes von drei Kindern des Kaufmannes Carl Heinrich Stahlheber und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Brock in Bochum i. W. geboren.

Während des Krieges zogen wir nach Bernburg an der Saale, wo ich von 1943 bis 1950 die Volksschule besuchte. Zurückgekehrt nach Bochum, trat ich 1950 in das städtische neusprachliche und naturwissenschaftliche Gymnasium (Goethe-Schule) ein. 1958 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab.

Nach Ableistung des einjährigen Grundwehrdienstes begann ich 1959 an der Universität zu Köln mit dem medizinischen Studium. Dort bestand ich im Sommersemester 1960 die naturwissenschaftliche Vorprüfung.

Im Sommersemester 1961 wechselte ich zur Universität München, an der ich im Wintersemester 1961/62 die ärztliche Vorprüfung und am 11. Juni 1965 die ärztliche Prüfung ablegte.

